

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 10 月 2 日 (02.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/080818 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 5/02, 5/06,
5/08, A61K 35/12, 38/19, A61P 25/00

口 昌徳 (SAKAGUCHI, Masanori) [JP/JP]; 〒160-8582
東京都 新宿区 信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部
内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/03868

(22) 国際出願日: 2003 年 3 月 27 日 (27.03.2003)

(74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052
東京都 港区 赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 Tokyo
(JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-89624 2002 年 3 月 27 日 (27.03.2002) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法
人 慶應義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒108-8345
東京都 港区 三田二丁目 1 5 番 4 5 号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 戸田 正博
(TODA, Masahiro) [JP/JP]; 〒160-8582 東京都 新宿区
信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).
岡野 栄之 (OKANO, Hideyuki) [JP/JP]; 〒160-8582 東
京都 新宿区 信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内
Tokyo (JP). 河上 裕 (KAWAKAMI, Yutaka) [JP/JP]; 〒
160-8582 東京都 新宿区 信濃町 3 5 番地 慶應義塾大
学医学部内 Tokyo (JP). 戸山 芳昭 (TOYAMA, Yoshi-
aki) [JP/JP]; 〒160-8582 東京都 新宿区 信濃町 3 5 番
地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 三上 裕嗣
(MIKAMI, Yuji) [JP/JP]; 〒160-8582 東京都 新宿区 信
濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 坂

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF INDUCING GROWTH OF NERVE STEM CELLS

(54) 発明の名称: 神経幹細胞の増殖誘導方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of efficiently inducing the growth of nerve stem cells, which are most important in transplantation therapy for nerve damage and neurological dysfunction, either *in vitro* or *in vivo*, a method of using the nerve stem cells obtained by the above growth induction method, etc. A mammalian nerve tissue containing nerve stem cells is separated and the nerve stem cells are selectively cultured in a medium containing growth factors such as EGF and FGF. Next, the nerve stem cells are co-cultured with dendritic cell such as an immature dendritic cell subset having a CD11c surface marker on the cell surface, spleen cells or blood cell-type cells such as CD8-positive T cells. Alternatively, the nerve stem cells after the culture are further cultured in the presence of GM-CSF or the nerve stem cells after the culture are further cultured in a culture supernatant of dendritic cells or a culture supernatant of blood cell-type cells.

(57) 要約: 神経損傷又は神経機能不全疾患の移植治療等に最も重要である神経幹細胞をインビトロ、インビボで効率良く増殖誘導する方法や、かかる増殖誘導方法により得られる神経幹細胞の利用方法等を提供するものである。神経幹細胞を含む哺乳類神経組織を分離し、EGF や FGF 等の成長因子を含む培養培地中で神経幹細胞を選択的に培養し、次いで神経幹細胞と、細胞表面に CD11c の表面マーカーを有する未成熟樹状細胞サブセット等の樹状細胞や、脾細胞、CD8 陽性 T 細胞等の血球系細胞とを共培養するか、培養後の神経幹細胞を GM-CSF の存在下に培養するか、又は、培養後の神経幹細胞を樹状細胞の培養上清や血球系細胞の培養上清中で神経幹細胞を培養する。

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/080818 A1

明 細 書

神経幹細胞の増殖誘導方法

5 技術分野

本発明は、多分化能を有する未分化な神経系の細胞である神経幹細胞の増殖誘導方法や、かかる増殖誘導方法により得られる神経幹細胞の利用や、神経幹細胞を増殖誘導するのに用いられる神経幹細胞の増殖誘導セットや、かかる神経幹細胞の増殖誘導セットの利用に関する。

10

背景技術

脊髄損傷の多くは外傷性で、その原因は交通事故、スポーツ事故、労働災害などであるが、非外傷性のものとしては、炎症、出血、腫瘍、脊椎変形などが原因となっている。病態は、脊髄実質に出血、浮腫を基盤とした脊髄の挫滅と圧迫病変であり、損傷部位に対応する神経障害が生じる。主な臨床症状として、障害レベル以下に、不全あるいは完全運動及び知覚麻痺が出現し、また、頸髄損傷では、特有な合併症として呼吸麻痺と過高熱（または過低熱）がみられる。上記神経障害の改善、特に運動障害の改善は、寝たきり老人増加の防止やQOL (Quality of Life)の向上に直結しており、近年の平均寿命の延長とともにその重要性が高まりつつある。

上記脊髄損傷の治療法として行なわれているのは、物理的な圧迫や傷害を除去するための外科的手術と、受傷急性期の脊髄浮腫に対してのステロイド療法である (N. Engl. J. Med. 322, 1405-1411, 1990、J. Neurosurg 93, 1-7, 2000)。ステロイド剤の中ではメチルプレドニゾロンの大量投与が脊髄損傷に伴う神経症状の改善に有効であると報告され

ている (J.Spinal Disord. 5(1), 125-131, 1992)。しかしながら、ステロイド剤の大量投与は全身的副作用も強く発現し、コントロールが難しいことに加え、感染症を伴う脊髄損傷では感染防御機能低下をきたすという問題点があり、さらには現在ステロイド大量投与療法の有効性についてさえ議論されている。以上の様に現在まで、脊髄損傷に対する有効な治療薬はなく、新しい治療薬の開発が切望されている。

上記以外の脊髄損傷の治療方法として報告されているものは、インビトロで炎症関連サイトカインにより前処理された神経膠星状細胞を中枢神経系 (CNS) 中の損傷部位に、治療上有効な量を移植する方法 (特表 2000-503983 号公報) や、同種の単核貪食細胞 (単球、マクロファージ等) を、損傷または疾患部位に、あるいはその近傍の中枢神経系 (CNS) に投与することにより、哺乳動物 CNS における神経軸索再生を促進する方法 (J. Mol. Med. 77, 713-717, 1999, J. Neurosci. 19(5), 1708-16, 1999, Neurosurgery 44(5), 1041-5, 1999, Trends. Neurosci 22(7), 295-9, 1999、特表平 11-13370 号公報など) である。また、明確な機序は不明であるが、spinal cord homogenate による vaccination や髄鞘蛋白質である myelin basic protein に特異的な T 細胞を投与することにより、脊髄損傷後の運動維持の回復を促進させたとの報告もなされている (Neuron 24, 639-647, 1999, Lancet 354, 286-287, 2000)。

近年欧米では、中脳黒質のドーパミン作動性ニューロンが変性・脱落するパーキンソン病に対して、胎児の脳細胞移植による臨床試験が行われた (Piccini P., et al., Nat Neurosci., 2, 1999, Freed C.R., et al., N. Engl. J. Med., 344, 2001)。本治療法により、60 歳未満の患者の運動能力が改善されることが明らかとなったが、この移植治療を一人のパーキンソン病患者に対して行うためには、5～10 体もの中絶胎児が必要

とされる。

一方、1992年 Weiss らのグループによりニューロスフェア (neurosphere) 法という神経幹細胞の選択的培養法が開発されたことにより、神経幹細胞の研究は大きな展開を迎えた (Reynolds B.A, et al. 5 J. Neurosci., 12, 1992)。神経幹細胞を含む細胞群を、分裂促進因子を含む無血清培養液で培養するもので、神経幹細胞のみが増殖して細胞塊 (ニューロスフェア) をなして浮遊する。さらにこの生起したニューロスフェアを一つ一つの細胞に分離してまた上記の無血清培養液で培養すると同様にニューロスフェアが形成される。またこのニューロスフェア 10 を上記の無血清培養液から分裂促進因子を除いて培養すると分化が誘導され、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの3種の細胞ができることが知られている。

他方、樹状細胞 (Dendritic Cell : DC) は造血幹細胞由来の樹枝状形態をとる細胞集団で、生体内に広く分布している。未成熟樹状細胞は、 15 それぞれの組織に侵入したウイルスや細菌をはじめとする異物を認識して取り込み、リンパ系器官T細胞領域への移動の過程で消化分解してペプチドを生成し、MHC分子に結合させて細胞表面に提示することにより抗原特異的なT細胞を活性化して免疫応答を誘導する抗原提示細胞としての役割を担っている (Ann. Rev. Immunol. 9, 271-296, 1991、J. Exp. 20 Med. 185, 2133-2141, 1997)。

樹状細胞は、その分布が広範であるものの各組織における密度が高くなかったために多数の細胞の調製は困難であった。しかしながら、未熟な前駆細胞の培養に分化増殖因子を添加することによりインビトロで多数の細胞が容易に調製可能になったことを受け、免疫賦活化剤として樹 25 状細胞を利用することが検討され始めている (J. Exp. Med. 183, 7-11, 1996)。とりわけ、微弱な腫瘍免疫応答に対して樹状細胞に抗原をパル

スすることにより特異的に免疫応答を増強しようとするものである。動物実験では、腫瘍由来のタンパク質や抗原ペプチドを提示した樹状細胞により特異的CD8⁺細胞障害性T細胞が誘導されることが示されており、ヒトでも同様に腫瘍由来のタンパク質や抗原ペプチドを樹状細胞とともに生体に戻すことにより腫瘍の減少あるいは消失が報告されている。

神経幹細胞は、分裂・増殖することができる自己複製能と同時に、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトという中枢神経系を構成する3種類の細胞に分化する能力、すなわち多分化能を有する未分化な神経系の細胞である (Temple S., Nature, 414, 2001)。近年極めて再生能力が低い成人脳においても神経幹細胞が存在することが明らかになり、さらにヒト神経幹細胞の分離、調製が可能になったことから、現在の再生医療研究において大変注目されている存在となっている。

最近、試験管内で増やした神経幹細胞をドーパミン作動性ニューロンへと分化誘導する方法が開発された。この方法により誘導された細胞をドナー細胞として移植することが可能になれば、多くの中絶胎児を必要とする現行の方法よりはるかに優れたパーキンソン病の治療法となることが期待され、またこのように今後、幹細胞生物学を駆使し、大量に調製された細胞を移植する治療が、さまざまな神経疾患に対して行われていくと思われる。本発明の課題は、このような移植治療に最も重要である神経幹細胞をインビトロ等で効率良く増殖誘導する方法などを提供することにある。

発明の開示

成体の脊髄損傷では、内在性神経幹細胞が脊髄内に存在しながらも、ニューロン新生は抑制されており、アストロサイトの増生のみが起きるものと考えられている。単に神経幹細胞を損傷部位に導入したとしても、

- ニューロンを作らずにグリアだけを作ってしまう、病態の改善にはつながらないことが予想される。したがって、神経幹細胞の移植に加えて、ニューロンを作るための微少環境の整備が不可欠と考えられる。一方、生体防御機構の一つとして、T細胞を中心とする抗原特異的な免疫反応
- 5 が存在するが、血液脳関門の存在、MHC抗原の極めて低い発現、リンパ組織の欠除などの理由から、中枢神経系は免疫系から隔絶された特殊な環境にある。そこで本発明者らは、免疫系が病変組織を排除して修復するという考えに基づき、損傷神経組織への免疫系の導入を試みた。具体的には、免疫系を調節するために最も重要な細胞である樹状細胞、また樹状細胞の誘導・増殖に重要なサイトカインである顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）を損傷神経組織に投与することにより、内在性の神経幹細胞が増殖誘導されることや、また、樹状細胞との共培養によるインビトロでの神経幹細胞の増殖誘導が生起することを発見し、本発明を完成するに至った。
- 10
- 15 すなわち本発明は、神経幹細胞を、樹状細胞、血球系細胞若しくはこれら細胞の培養上清、又は顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）の少なくともいずれか一種と接触させることを特徴とする神経幹細胞の増殖誘導方法（請求項1）や、神経幹細胞を、樹状細胞、血球系細胞、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）
- 20 の少なくともいずれか一種と培養培地中で接触させることを特徴とする請求項1記載の神経幹細胞の増殖誘導方法（請求項2）や、神経幹細胞を含む哺乳類神経組織を分離し、成長因子を含む培養培地中で神経幹細胞を選択的に培養し、次いで神経幹細胞と樹状細胞及び／又は血球系細胞とを共培養することを特徴とする請求項2記載の神経幹細胞の増殖誘導方法（請求項3）や、神経幹細胞を含む哺乳類神経組織を分離し、成長因子を含む培養培地中で神経幹細胞を選択的に培養し、次いで樹状細胞
- 25

胞の培養上清及び／又は血球系細胞の培養上清中で神経幹細胞を培養することを特徴とする請求項 2 記載の神経幹細胞の増殖誘導方法（請求項 4）や、成長因子を含む培養培地が、少なくとも EGF 及び／又は FGF を含む培養培地であることを特徴とする請求項 2～4 のいずれか記載
5 の神経幹細胞の増殖誘導方法（請求項 5）や、樹状細胞が、細胞表面に CD11c の表面マーカーを有する未成熟樹状細胞サブセット、又は該未成熟樹状細胞に由来する成熟樹状細胞サブセットであることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導方法（請求項 6）や、血球系細胞が、脾細胞、T細胞、単球、好中球、好酸球又は好塩基球であることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導方法（請求項 7）に関する。
10

また本発明は、樹状細胞、血球系細胞若しくはこれら細胞の培養上清、又は顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）の少なくともいずれか一種を備えていることを特徴とする神経幹細胞の増殖誘導セット（請求項 8）や、さらに、成長因子を含む培養培地を備えていることを特徴とする請求項 8 記載の神経幹細胞の増殖誘導セット（請求項 9）や、成長因子を含む培養培地が、少なくとも EGF 及び／又は FGF を含む培養培地であることを特徴とする請求項 9 記載の神経幹細胞の増殖誘導セット（請求項 10）や、樹状細胞が、細胞表面に CD11c の表面マーカーを有する未成熟樹状細胞サブセット、又は該未成熟樹状細胞に由来する成熟樹状細胞サブセットであることを特徴とする請求項 8～10 のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導セット（請求項 11）や、血球系細胞が、脾細胞、T細胞、単球、好中球、好酸球又は好塩基球であることを特徴とする請求項 8～11 のいずれか記載の神経幹細胞
20 の増殖誘導セット（請求項 12）に関する。
25

さらに本発明は、請求項 1～7 のいずれか記載の増殖誘導方法により

- 得られる神経幹細胞を有効成分とすることを特徴とする神経損傷又は神経機能不全疾患の治療薬（請求項 1 3）や、請求項 8 ～ 1 2 のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導セットを有効成分とすることを特徴とする神経損傷又は神経機能不全疾患の治療薬（請求項 1 4）や、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）を有効成分とすることを特徴とする脳梗塞の治療薬（請求項 1 5）や、請求項 1 ～ 7 のいずれか記載の増殖誘導方法により得られる神経幹細胞を投与することを特徴とする神経損傷又は神経機能不全疾患の治療方法（請求項 1 6）や、請求項 8 ～ 1 2 のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導セットを投与することを特徴とする神経損傷又は神経機能不全疾患の治療方法（請求項 1 7）や、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）を投与することを特徴とする脳梗塞の治療方法（請求項 1 8）に関する。

図面の簡単な説明

- 第 1 図は、樹状細胞移植後の Musashi-1 陽性細胞数の計測のための領域設定を示す図である。
- 第 2 図は、樹状細胞（DC）、RPMI 1640（RPMI）移植群それぞれにおける、抗 Musashi-1 抗体を用いた免疫染色の結果、特に損傷辺縁部から頭側にかけての経時的な代表的切片を示す図である。
- 第 3 図は、樹状細胞、RPMI 1640 移植群それぞれにおける、Musashi-1 陽性細胞数の領域別の経時的変化を示す図である。
- 第 4 図は、樹状細胞移植による神経細胞の解析結果を示す図である。
- A：損傷後 14 日目の樹状細胞移植群における抗 Hu 抗体、抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色の結果（代表的切片）を示す図である。
- B：A 図内の四角で示した部分の拡大像であり、免疫染色の結果を抗体別に示す図である。

C : B 図で示した細胞における、連続的な細胞断面像を示す図である。

D : 樹状細胞、コントロールである R P M I 1 6 4 0 移植群それぞれにおける H u 陽性かつ B r d U 陽性の細胞数の経時的変化を示す図である。

E : 損傷後 1 4 日目の樹状細胞移植群における抗 H u 抗体、抗 B r d U 抗体を用いた免疫染色に T U N E L 染色を重ねて行った結果（代表的染色例）を示す図である。

第 5 図は、切断した神経軸索に対する樹状細胞移植効果の結果を示す図である。

10 A : 損傷後 4 ヶ月の樹状細胞移植群における、順行性トレーサー B D A 陽性の皮質脊髄路を示す代表的切片である。図中の G は損傷部位に挿入した g e l f o r m を示す。

B : 損傷後 4 ヶ月のコントロールである R P M I 1 6 4 0 移植群における中心管周辺の B D A 陽性の神経軸索を示す代表的切片である。

15 C : 損傷後 4 ヶ月の樹状細胞移植群における中心管周辺の B D A 陽性の神経軸索を示す代表的切片である。

D : C 図内の四角で示した部分の拡大像を示す図である。

E : D 図内の四角で示した部分の拡大像を示す図である。

第 6 図は、樹状細胞との共培養により形成されたニューロスフェアの数を示す図である。それぞれ解析した 4 w e l l の平均値を示した。

20 第 7 図は、樹状細胞との共培養により形成されたニューロスフェアの体積を示す図である。それぞれ解析した 4 w e l l の平均値を示した。

第 8 図は、樹状細胞、脾細胞、T 細胞、マクロファージの各免疫細胞 10^5 個（ 10^6 個 / m l）を、primary ニューロスフィアを形成した神経幹細胞 1 0 0 個と 7 日間共培養した場合の、secondary ニューロスフィア（直径 1 0 0 μ m 以上）形成数を示す図である。

第 9 図は、樹状細胞、脾細胞、T 細胞の培養上清を用いた培養により

形成されたニューロスフェアの数を示す図である。解析した 4 well の平均値を示した。

第 10 図は、樹状細胞、脾細胞、T細胞の培養上清を用いた培養により形成されたニューロスフェアの体積を示す図である。形成されたニューロスフェアの平均値を示した。

第 11 図は、樹状細胞 10^5 個の培養上清 (10^6 個/ml) を用いて、primary ニューロスフィアを形成した神経幹細胞 100 個を 7 日間培養した場合の、secondary ニューロスフィア (直径 50 μ m 以上) 形成数を示す図である。

10 第 12 図は、GM-CSF 投与後の Musashi-1 陽性細胞数の計測のための領域設定を示す図である。

第 13 図は、GM-CSF 投与後の Musashi-1 陽性細胞数の経時的変化を示す図である。

15 第 14 図は、脊髄損傷後 7 日目の内在性神経幹細胞/前駆細胞を解析した図である。

a : Musashi-1 抗体、BrdU 抗体、GFAP 抗体の 3 重染色による代表的切片の染色像を示す図である。

b : それぞれの抗体による解析像を示す図である。

20 c : Musashi-1 (+) BrdU (+) GFAP (-) である内在性神経幹細胞/前駆細胞の定量的計測結果を示す図である。

第 15 図は、脊髄損傷後 7 日目の CD11c 陽性樹状細胞を解析した図である。

a : 損傷部位への GM-CSF 投与により、樹状細胞数が増加することを示す図である。

25 b : 損傷脊髄には CD11c 陽性の樹状細胞が認められることを示す図である。

c : 正常マウス脊髄には明らかなCD11c陽性の樹状細胞が検出されなかったことを示す図である。

d : GM-CSF投与により有意にCD11c陽性の樹状細胞数が増加することを示す図である。

5 第16図は、GM-CSF投与による神経細胞の解析結果を示す図である。

a : 損傷後14日目における抗Hu抗体（緑）、抗BrdU抗体（赤）を用いた新生された神経細胞を解析した代表的切片を示す図である。

b : 損傷後14日目におけるHu陽性かつBrdU陽性の新生された神経細胞数を示す図である。

第17図は、脳梗塞（MCAO）48時間後の代表的なTTC染色像を示す図である。

第18図は、GM-CSFを脳梗塞直後に血管内投与することにより、総脳梗塞体積が減少することを示す図である。

15 第19図は、GM-CSFを脳梗塞直後に血管内投与することにより、大脳皮質(cortex)における脳梗塞体積が減少することを示す図である。

第20図は、脳梗塞直後と48時間後におけるGM-CSF投与およびコントロール群の神経学的所見を示す図である。

20 第21図は、脳梗塞（MCAO）48時間後に脳切片を作製し、TUNEL染色により脳梗塞境界領域(penumbra)におけるアポトーシスを解析した結果を示す図である。

第22図は、脳梗塞（MCAO）48時間後に脳切片を作製し、OX42抗体を用いたより脳梗塞境界領域(penumbra)における活性化マイクログリアの解析結果を示す図である。

25

発明を実施するための最良の形態

本発明の神経幹細胞の増殖誘導方法としては、神経幹細胞を、樹状細胞、血球系細胞若しくはこれら細胞の培養上清、又は顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）の少なくともいずれかと接触させる方法であれば、インビトロ、インビボ、エキスピボを問わず、特に制限されるものではないが、大量に調製された神経幹細胞を必要とする移植治療を考慮すると、神経幹細胞を樹状細胞、血球系細胞、GM-CSFから選ばれる少なくともいずれか一種と、DMEM/F12培地等の培養培地中で接触させ、神経幹細胞の増殖を誘導する方法が好ましい。具体的には、分裂・増殖することができる自己複製能と同時に、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトという中枢神経系を構成する3種類の細胞に分化する多分化能を有する神経幹細胞を含む哺乳類神経組織、例えば胎仔の被殻-線条体部位等を分離・採取し、成長因子を含む培養培地中で神経幹細胞を選択的に培養し、必要に応じて神経幹細胞の純度を高める処理を施した後、かかる神経幹細胞と樹状細胞及び／又は血球系細胞とを培養培地中で共培養することにより接触させる神経幹細胞を増殖誘導する方法を挙げることができる。また、上記樹状細胞及び／又は血球系細胞との共培養の有無にかかわらず、GM-CSFの存在下で神経幹細胞を培養することにより接触させ、神経幹細胞を増殖誘導する方法も挙げることができる。さらに、上記と同様に、神経幹細胞を含む哺乳類神経組織を分離し、成長因子を含む培養培地中で神経幹細胞を選択的に培養し、次いで樹状細胞の培養上清及び／又は血球系細胞の培養上清中で神経幹細胞を培養することにより接触させ、神経幹細胞を増殖誘導する方法も好適に例示することができる。

上記成長因子としては、上皮増殖因子（EGF）、酸性の繊維芽細胞成長因子（aFGF又はFGF-1）、塩基性の繊維芽細胞成長因子（bFGF又はFGF-2）、トランスフォーミング成長因子 α （TGF α ）、

アンフィレグリン、ベタセルリン (BTC)、エプレグリン (ER)、
ヘパリン結合EGF様増殖因子 (HB-EGF)、神経線維腫由来増殖因子 (SDGF) 等を例示することができ、中でもEGFやFGFを好適
に例示することができる。また、上記成長因子を含む培養培地には、E
GFやFGF等の成長因子の他に、トランスフェリン、インシュリン
(Insulin)、レチノイン酸、アクチビン、インターロイキン等の、細胞
の培養に通常使用される成分を添加しておくこともできる。

上記樹状細胞としては、細胞表面にCD11cの表面マーカーを有する未成熟樹状細胞サブセット、又は該未成熟樹状細胞に由来する成熟樹
状細胞サブセットを好適に例示することができ、かかる樹状細胞サブセ
ットには、インビボでの神経再生効果やマイクログリアの増殖、食作用
の増強を誘導する神経栄養因子NT-3を分泌する樹状細胞サブセット
や、NT-3に加えて、脊髄運動知覚両神経に対し変性・細胞死保護の
効果が示すCNTF (神経栄養因子)、マイクログリアやマクロファージ
由来の細胞障害性物質の放出の抑制作用を有するTGF- β 1、各種ニ
ューロン (コリン・カテコールアミン・ドーパミン作動性) に対する保
護効果を誘導するIL-6を発現する未成熟樹状細胞サブセットや、N
T-3に加えて、CNTF、TGF- β 1、IL-6、神経保護効果の
認められているEGFを発現する成熟樹状細胞サブセットが含まれる。
また、上記成熟樹状細胞サブセットとして、LPS、IL-1、TNF- α 、CD40L等の未成熟樹状細胞を成熟させるための刺激剤の存在
下で、未成熟樹状細胞サブセットをインビトロで培養することにより得
られる成熟樹状細胞サブセットを用いることもできる。

細胞表面にCD11cの表面マーカーを有する未成熟樹状細胞サブセ
ットは、例えば、末梢血等に対し密度遠心分離処理等の前処理を行った
後、樹状細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体を用いてFACSで

ソートする方法や、樹状細胞表面抗原に対する磁気ビーズ結合モノクローナル抗体を用いる分離方法等により樹状細胞サブセットを分離し、それらの中からCD11c陽性の樹状細胞サブセットを選択することにより得ることができる。そして、神経幹細胞と接触させる樹状細胞は、該

5 神経幹細胞と同種のものが好ましく、また、神経幹細胞と接触させる樹状細胞数は、細胞数比において神経幹細胞の 10^3 以上が、神経幹細胞の顕著な増殖誘導の点で好ましい。

上記血球系細胞としては、脾細胞、T細胞、単球、好中球、好酸球、好塩基球等を具体的に例示することができるが、T細胞、特にCD8陽

10 性T細胞や脾細胞を好適に例示することができる。

次に、本発明の神経幹細胞の増殖誘導セットとしては、樹状細胞、血球系細胞若しくはこれら細胞の培養上清、又はGM-CSFの少なくともいずれか一種を備えている細胞増殖誘導セットであれば特に制限されるものではないが、上記EGF、FGF等の成長因子などの各種成分を

15 さらに含む培養培地を備えているものが好ましい。また、上記樹状細胞としては、細胞表面にCD11cの表面マーカーを有する未成熟樹状細胞サブセット、あるいは該未成熟樹状細胞に由来する成熟樹状細胞サブセットが好ましく、血球系細胞としては、脾細胞、T細胞、単球、好中球、好酸球又は好塩基球が好ましい。

20 本発明の神経幹細胞の増殖誘導方法をインビトロ又はエキスピボで実施し、得られた神経幹細胞を用いたり、あるいは本発明の神経幹細胞の増殖誘導方法をインピボで実施することにより、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病等の変性性疾患や、中枢神経系に対する外傷性及び神経毒性損傷や、虚血神経系への血流又は酸素供給阻害に起

25 因する脳梗塞等の疾病などの治療が可能になる。従って、本発明の増殖誘導方法により得られる神経幹細胞や神経幹細胞の増殖誘導セットは、

上記神経損傷又は神経機能不全疾患治療薬として有用である。また、本発明の増殖誘導方法により得られる神経幹細胞や本発明の神経幹細胞の増殖誘導セットを投与すると、上記神経損傷又は神経機能不全疾患の治療が可能となる。例えば、GM-CSFは脊髄損傷の治療薬としてまた
5 脳梗塞の治療薬として有用であり、GM-CSFの局所投与あるいは全身投与により、脊髄損傷や脳梗塞の治療が可能となる。

上記神経幹細胞の増殖誘導セットを神経損傷又は神経機能不全疾患治療薬として用いる場合は、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、
10 等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。またかかる治療剤は、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口に局所に投与する
15 ことができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできる。

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。
20

実施例 1（樹状細胞の分離）

免疫磁気ピーズ法にて、生後 6 週齢の BALB/c あるいは C57BL/6 雌成熟マウス脾臓より、CD11c 陽性のサブセットを分離し、未成熟樹状細胞を得た。具体的には、まず脾臓を 100 U/ml コラーゲナーゼ（Worthington Biochemical Corporation 社）にてホモジェネ
25 ートした後、分離しにくい被膜部分をさらに 400 U/ml コラーゲナー

ーゼにて37℃、5%CO₂下に20分間インキュベートし、細胞を分離した。得られた細胞を35%BSA溶液中に浮遊させて、遠心管中でさらにRPMI 1640+10%胎児血清を重層させた後、4℃、3000rpm、30分間遠心し、35%BSA溶液とRPMI 1640+10%胎児血清溶液との境界層の細胞を回収した。次に得られた細胞に対して、CD11c抗原に対する磁気ビーズ結合モノクローナル抗体(2×10⁸ビーズ、Miltenyi Biotec 社)を4℃にて、15分間反応させ、ビーズ結合細胞を磁気により分離することにより、未成熟樹状細胞サブセットが濃縮された画分を得た。

- 10 実施例2(樹状細胞移植による内在性神経幹細胞/前駆細胞の増殖誘導)
- 生後6週齢のBALB/cあるいはC57BL/6マウスを用い、エーテル麻酔下に第8胸椎椎弓切除を行い、尖刀にて脊髄を左半切した脊髄損傷モデルマウスを作製した。損傷後直ちにRPMI 1640培地のみ、又は免疫磁気ビーズ法にてCD11c(+)のサブセットをソート
- 15 することによって得られた樹状細胞[1×10⁵個/マウス]を脊髄損傷部位に移植した。

- 樹状細胞移植による内在性神経幹細胞/前駆細胞の反応性を検討するため、それらを認識するMusashi-1抗体を用いて、免疫組織染色を行い、陽性細胞数の経時的な変化を調べた。まず、損傷後2、4、
- 20 7日の樹状細胞移植マウスについて、2%パラフォルムアルデヒドで経心臓的灌流固定を行い、凍結切片を作製した(各群n=3)。次に、一次抗体として抗マウスMusashi-1抗体を利用した免疫組織染色を行った。Musashi-1は1994年にOkanoらにより同定された分子量約38kDaのRNA結合タンパクであり(Neuron, 1994)、マ
- 25 ウスのMusashi-1に対するモノクローナル抗体を用いた解析では神経幹細胞/前駆細胞に強く発現することが報告されている(Dev.

Biol. 1996、J. Neurosci. 1997、Dev. Neurosci. 2000)。計測領域に関しては、細胞を移植する際に用いた g e l f o a m（変性コラーゲン）の最も遠位部、及びそこから 1 mm 離れた地点それぞれで、背側から腹側に至る部分として、損傷辺縁部、遠位部（頭側・尾側）の 2 つに分類した（図 1 参照）。

損傷辺縁部から頭側にかけての代表的切片の染色像を図 2 に示す。両群ともに、損傷後 2 日では差はみられないが、損傷後 4 日以降では、樹状細胞移植群において、辺縁部、遠位部ともに M u s a s h i - 1 陽性細胞が多く認められた。また、コントロール群ではこのような変化は乏しかった。

次に M u s a s h i - 1 陽性細胞を画像解析装置（Flovel 社）を用いて定量的に解析した。図 3 に M u s a s h i - 1 陽性細胞数の領域別の経時的変化を示す。損傷後 4 日以降で損傷辺縁部や遠位部ともに、コントロールと比較して樹状細胞移植により有意な M u s a s h i - 1 陽性細胞数の増加を認めた。特に損傷辺縁部では、損傷後 2 日から 4 日の間に樹状細胞移植群で M u s a s h i - 1 陽性細胞の著しい増加が認められた。

以上のことより、損傷部位への樹状細胞移植により、内在性神経幹細胞／前駆細胞の増殖が誘導されることが明らかとなった。

実施例 3（樹状細胞移植による神経細胞の解析）

樹状細胞移植により内在性の神経幹細胞／前駆細胞が有意に増殖していることが明らかとなったが、損傷後 14 日目になると 7 日目と比較して、神経幹細胞／前駆細胞が減少し、形態変化が観察された。そこで、神経幹細胞が神経細胞へ分化したのではないかと考え、樹状細胞移植による神経細胞新生の可能性を検討した。C 5 7 B L / 6 成熟マウスの脊髄を損傷させ、樹状細胞を移植後 7 日、14 日目に 4 % パラフォルムア

ルデヒドで経心臓的灌流固定を行い、矢状断凍結切片を作製した（ $n = 3$ ）。コントロールとして、RPMI 1640 移植群を用いた（ $n = 3$ ）。分裂増殖細胞を標識するため、チミジンのアナログである bromodeoxyuridine（BrdU、Sigma 社）を損傷後、灌流固定前日まで毎日腹腔内投与した（ 50 mg/kg ）。一次抗体として抗ラット BrdU 抗体（Abcam 社）、有糸分裂後のニューロンを認識する Hu 抗体（Dr James 岡野から供与）を利用した免疫染色を行った。染色結果は共焦点レーザー顕微鏡（Zeiss 社）を用いて確認した。計測領域に関しては、細胞を移植する際に用いた gelfoam（変性コラーゲン）の最も遠位部から 0.5 mm 離れた地点から 1 mm 離れた地点までの切片上でのすべての灰白質部分として、頭側・尾側の両方で行った。樹状細胞移植群の損傷後 14 日目の代表的切片の染色像を図 4 A に示し、さらに図 4 A 中の拡大像を図 4 B、図 4 C に示す。計測結果を図 4 D に示す。その結果、損傷後 14 日目の樹状細胞移植群でのみニューロンが新生していること（矢印）が明らかとなった。さらに、アポトーシスに陥っている細胞でも BrdU 陽性となることが知られているため、アポトーシス細胞を特異的に検出できる TUNEL 法を用いた免疫染色を重ねた結果を図 4 E に示す。その結果、Hu/BrdU 二重陽性細胞は TUNEL 染色が陰性であったこと、またアポトーシス細胞の核に特徴的な断片化像も否定的であったことから、損傷脊髄に樹状細胞を移植することにより、新しいニューロンが分化誘導されていることが明らかとなった。中枢神経系の中でも脊髄は神経新生が起こらないと考えられてきた組織であった。しかしながら、本発明によって、成熟哺乳動物の脊髄において、樹状細胞移植により神経が新生されることを証明することができた。

25 実施例 4（樹状細胞移植による損傷神経軸索の再生）

切断した神経軸索に対する樹状細胞移植の効果を調べるため、損傷後

4ヶ月経過したBALB/cマウスを用いて、大脳皮質一次運動野に順行性トレーサーであるBDA (biotinylated dextran amine、分子量10000、Molecular Probes社) を注入し、皮質脊髄路の再生について検討した。トレーサーを注入後14日の樹状細胞移植マウスについて、

5 4%パラフォルムアルデヒドで経心臓的灌流固定を行い、冠状断凍結切片を作製した(n=10)。コントロールとして、RPMI 1640移植群を用いた(n=7)。両群とも、皮質脊髄路におけるBDA陽性の神経軸索は、細胞移植の際に用いたgel foamよりも頭側の位置で途絶しており、損傷部より尾側の領域では認めることができなかった(図5

10 A)。中心管(*印)の周辺においては、コントロール群はやはりBDA陽性の神経軸索(0.5mm以上連続性を有するもの)を損傷部より尾側の領域では認めることがなかったが(図5B)、樹状細胞移植群では、損傷部より尾側において、皮質脊髄路ではない灰白質の領域にBDA陽性の神経軸索を認めた(図5C、n=5)。その部分の拡大像を図5D(矢印)、さらに図5Eに示す。この結果は、過去に報告されている神経軸索の再生例(Exp.Neurol. 1990, Science 1996, J.Neurosci. 2000)と類似した形態(矢印、矢頭)を有していた。以上より、樹状細胞移植により損傷神経軸索を再生させることが明らかとなった。

15 実施例5 (樹状細胞との共培養によるインビトロでの神経幹細胞の増殖誘導)

20 誘導)

損傷部位への樹状細胞移植により、内在性神経幹細胞/前駆細胞の増殖を誘導することが明らかとなったが、培養下でも樹状細胞が神経幹細胞を増殖させることが可能であるかを解析した。神経幹細胞の増殖誘導は、神経幹細胞の分離培養を2段階で行った。まず第一段階はC57BL/6胎仔(妊娠14日目)の被殻一線条体部位を採取し、 1×10^5

25 細胞/mlの細胞密度で、DMEM/F12培地にEGF (peprotech

社) 20 ng/ml 、FGF-2 (R&D 社) 20 ng/ml 、トランスフェリン (Sigma 社) $100 \mu\text{g/ml}$ 、インシュリン (Sigma 社) $25 \mu\text{g/ml}$ 、Progesterone (Sigma 社) 20 nM 、Sodium selenate (Sigma 社) 30 nM 、Putrescine (Sigma 社) $60 \mu\text{M}$ を添加した培養液で5～7日間培養することで、選択的に神経幹細胞を培養した。

さらに得られた神経幹細胞の純度を高めるため、セルソーターを用いてPI染色陰性でかつ直径 $10 \mu\text{m}$ 以上の細胞を分離した後、 100 細胞/wellになるようにプレティングして、樹状細胞との共培養を開始した。セルソーターはベクトンディッキンソン社 FACS Vantage SE を、解析には Clone cyte plus を用いた。神経幹細胞との共培養に用いる樹状細胞は、C57BL/6 雌成熟マウス脾臓よりCD11c 陽性のサブセットを分離して $1 \times 10^3 \sim 10^5$ 細胞/mlの細胞密度になるように前記培養液中に調整し、96well 低接着培養プレートに $100 \mu\text{l}$ ずつ加えた。コントロールとして、細胞を加えない群 (基本的なニューロスフェアを培養する条件) と、樹状細胞の分泌する最も重要な神経栄養因子であるNT-3 ($1 \sim 10 \text{ ng/ml}$) を添加する群を加え、神経幹細胞の培養を行った。

増殖した神経幹細胞は、直径 $50 \mu\text{m}$ 以上のニューロスフェア (neurosphere) と呼ばれる細胞凝集塊を形成するため、共培養開始後8日後に、それぞれの条件におけるニューロスフェアの数 (図6) 及びその体積 (図7) を測定・検討したところ、一般的なニューロスフェアを培養する条件と比較して、樹状細胞 (DC) と共培養することにより、顕著に神経幹細胞を増殖させることが明らかとなった。

次に、コントロールとして脾細胞、T細胞、マクロファージを用いて、樹状細胞による神経幹細胞の反応性について検討した。これらの各細胞 10^5 個 (10^6 個/ml) を、primary ニューロスフィアを形成した神

神経幹細胞 100 個と 7 日間共培養したところ、樹状細胞と共培養した場合、secondary ニューロスフィア（直径 100 μm 以上）形成数は一般的ニューロスフィアの培養液のみと比較して著しく増加した（図 8）。一方、T 細胞、マクロファージと共培養した場合では直径 100 μm 以上の secondary ニューロスフィアの形成が認められなかったことから、樹状細胞は他の免疫系細胞と比較して、インビトロで共培養することにより神経幹細胞を顕著に増殖させることが明らかとなった。

実施例 6（樹状細胞の培養上清を用いたインビトロでの神経幹細胞の増殖誘導）

- 10 さらに樹状細胞の分泌する物質が神経幹細胞の増殖誘導に働くかどうかの検討を行った。本実験では、樹状細胞のみならず、血球系細胞である脾細胞、T 細胞の培養上清を用いてニューロスフェアの数及び体積の解析を行った。実施例 4 と同様の方法で神経幹細胞の分離を行った。すなわち、C57BL/6 胎仔（妊娠 14 日目）の被殻－線条体部位を採取し、 1×10^5 細胞/ ml の細胞密度で、DMEM/F12 培地に EGF (peprotech 社) 20 ng/ ml 、FGF-2 (R&D 社) 20 ng/ ml 、トランスフェリン (Sigma 社) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、インシュリン (Sigma 社) 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、Progesterone (Sigma 社) 20 nM、Sodium selenate (Sigma 社) 30 nM、Putrescine (Sigma 社) 60 μM を添加した培養液で、5～7 日間培養することで、選択的に神経幹細胞を培養した。さらに得られた神経幹細胞の純度を高めるため、セルソーターを用いて、PI 染色陰性でかつ直径 10 μm 以上の細胞を分離した後、100 細胞/ ml になるようにプレーティングした。

- 25 C57BL/6 雌成熟マウス脾臓より、脾細胞を調製し、CD11c 陽性のサブセットを樹状細胞として、CD8 陽性のサブセットを CD8 T 細胞として分離し、前記培養液中で、24 時間培養後、その培養上清

を回収した。コントロールとして、細胞を加えない群（基本的なニューロスフェアを培養する条件）を加え、神経幹細胞の培養を行った。増殖した神経幹細胞は、直径 $50\ \mu\text{m}$ 以上のニューロスフェア（neurosphere）と呼ばれる細胞凝集塊を形成するため、共培養開始 8 日後に、それぞれの条件におけるニューロスフェアの数（図 9）及びその体積（図 10）を測定・検討したところ、一般的なニューロスフェアを培養する条件と比較して、樹状細胞（DC）のみならず、脾細胞（SPC）、CD8 陽性 T 細胞（CD8-T）の培養上清により、神経幹細胞を増殖させることが明らかとなった。

- 次に、樹状細胞の分泌する培養上清中の物質が神経幹細胞を増殖させることを再確認するため、 10^5 個の樹状細胞の培養上清（ 10^6 個/ m l 、48、72、96 時間）を用いて、primary ニューロスフィアを形成した神経幹細胞 100 個を 7 日間培養したところ、 10^5 個の樹状細胞との共培養の場合の約 $1/10$ であったものの、secondary ニューロスフィア（直径 $50\ \mu\text{m}$ 以上）の形成を認めた（図 11）。培養液のみの場合では secondary ニューロスフィア（直径 $50\ \mu\text{m}$ 以上）の形成が全く認められなかったことから、神経幹細胞を増殖させる樹状細胞の分泌因子の存在が確認された。

実施例 7（GM-CSF 投与による内在性神経幹細胞／前駆細胞の増殖誘導）

- 樹状細胞の誘導・増殖に重要なサイトカインである GM-CSF を投与することによる中枢神経系内の神経幹細胞／前駆細胞に対する反応性を解析するため、それらを認識する Musashi-1 抗体を用いて、免疫組織染色を行い、陽性細胞数の経時的な変化を調べた。生後 6 週齢の BALB/c 雌マウスを用いて、脊髄損傷モデルマウスを作製し、損傷直後に、生理食塩水のみ又は GM-CSF（ $250\ \text{pg}$ /マウス；

Genzyme 社) を $5 \mu\text{l}$ 脊髄損傷部位に投与した (各群 $n = 3$)。損傷後 2、4、7 日目に 2% パラフォルムアルデヒドで経心臓的灌流固定を行い、凍結切片を作製した。次に、一次抗体として抗 Musashi-1 抗体を利用した免疫組織染色を行った。計測領域に関しては、細胞を移植する際に用いた gel foam の最も遠位部から背側および腹側 0.5 mm 離れた領域を画像解析装置 (Flovel 社) を用いて定量的に解析した (図 12)。図 13 に Musashi-1 陽性細胞数の経時的変化を示す。GM-CSF 投与群では損傷後 2 日目からコントロールと比較して多数の Musashi-1 陽性細胞を認め、7 日目において有意な細胞数の増加を認めた。以上のことから、損傷部位への GM-CSF 投与により、神経組織内における内在性神経幹細胞/前駆細胞が増殖誘導されることが明らかとなった。

損傷部位局所に GM-CSF を投与することにより、内在性神経幹細胞/前駆細胞が増加することを明らかにしたが、さらに神経幹細胞/前駆細胞のマーカーである Musashi-1 抗体に加えてグリア細胞マーカー (GFAP 抗体) を用いた解析、増殖細胞であることを証明するために、BrdU 標識による解析を行った。生後 6 週齢のマウスを用いて脊髄損傷モデルを作製し、損傷直後に生理食塩水のみまたは GM-CSF (250 pg/マウス ; Genzyme 社) を $5 \mu\text{l}$ 損傷部位に投与した。分裂増殖細胞を標識するため、チミジンのアナログである BrdU (Sigma 社) を損傷後、損傷後 7 日目に灌流固定する前日まで毎日腹腔内投与した (50 mg/kg)。凍結切片を作製し、一次抗体として抗 Musashi-1 抗体、抗ラット BrdU 抗体 (Abcam 社)、抗マウス GFAP 抗体 (Sigma 社) を利用した免疫組織学的解析を行った。損傷後、増殖している内在性神経幹細胞/前駆細胞を Musashi-1 (+) BrdU (+) GFAP (-) として計測した。損傷後 7

日目の代表的切片の染色像を図 1 4 a に示し、さらに図 1 4 b 中ではそれぞれの抗体による解析像を示す。定量的計測結果を図 1 4 c に示したが、損傷後 7 日では、GM-CSF 投与により内在性神経幹細胞／前駆細胞が有意に増殖していたことが確認された。

5 実施例 8 (損傷部位への GM-CSF 投与による脊髄内樹状細胞の誘導)

生後 6 週齢のマウスを用いて脊髄損傷モデルを作製し、損傷直後に生理食塩水のみまたは GM-CSF (250 pg/マウス; Genzyme 社) を 5 μ l 損傷部位に投与した。損傷後 7 日目において、マウスを灌流固定して、凍結切片を作製し、免疫組織学的解析を行った。抗 CD11c

10 抗体 (Pharmingen 社) を用いて脊髄内の樹状細胞を解析したところ、正常マウス脊髄には明らかな CD11c 陽性の樹状細胞は検出されなかったが (図 1 5 c)、損傷脊髄には CD11c 陽性の樹状細胞が認められ (図 1 5 b)、損傷部位への GM-CSF 投与により、さらに樹状細胞の数が増加していた (図 1 5 a)。外傷部位より頭尾側それぞれ 0.75-1.

15 2.5 mm の範囲で定量的な解析を行ったところ、GM-CSF 投与により有意に CD11c 陽性の樹状細胞数が増加していた (GM-CSF, n=6; コントロール, n=6; 正常脊髄マウス, n=2) (図 1 5 d)。損傷神経に移植された樹状細胞は神経幹細胞を増殖誘導し、神経細胞の新生、神経軸索の再生など様々な神経保護、再生効果をもたらす。これ

20 まで、正常中枢神経系には樹状細胞は存在しないと考えられてきたが、損傷により樹状細胞が中枢神経系にも誘導されること、また GM-CSF 投与によりさらに多くの樹状細胞が誘導されることが明らかとなった。
実施例 9 (GM-CSF 投与による神経細胞の解析)

25 損傷脊髄において樹状細胞を移植することにより、新しいニューロンが分化誘導されることが明らかとなったことから、GM-CSF 投与による神経細胞の解析を行った。マウスに脊髄損傷を作製し、GM-CSF

F 投与後 14 日目に灌流固定を行い、矢状断凍結切片を作製した (n = 3)。コントロールとして、生理食塩水投与群を用いた (n = 3)。分裂増殖細胞を標識するため、チミジンのアナログである B r d U (Sigma 社) を損傷後、灌流固定前日まで毎日腹腔内投与した (50 mg / kg マウス)。一次抗体として抗ラット B r d U 抗体 (Abcam 社)、有糸分裂後のニューロンを認識する H u 抗体 (Dr James 岡野から供与) を利用した免疫染色を行った。染色結果は共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss 社) を用いて確認した。計測領域に関しては、細胞を移植する際に用いた g e l f o a m (変性コラーゲン) の最も遠位部から 0.25 mm 離れた地点から 0.75 mm 離れた地点までの切片上でのすべての灰白質部分として、頭側・尾側の両方で行った。GM-CSF 投与群の損傷後 14 日目の代表的切片の染色像を図 16 a に示し、定量的計測結果を図 16 b に示した。その結果、損傷後 14 日目の GM-CSF 群でのみニューロンが新生していることが明らかとなった。中枢神経系の中でも脊髄は神経新生が起こらないと考えられてきた組織である。しかしながら、本発明によって、GM-CSF 投与により成熟哺乳動物の脊髄において神経が新生されることを証明することができた。

実施例 10 (GM-CSF 投与後の脳梗塞に対する治療効果)

次に、GM-CSF 投与における脊髄損傷以外の神経疾患に対する治療効果を調べた。ラット脳梗塞モデルを作製し、GM-CSF を血管内から投与後の脳梗塞巣、神経学的所見、脳梗塞境界領域 (penumbra) におけるアポトーシス、および活性化マイクログリアの解析を行った。脳梗塞モデルの作成は、小泉・Zea Longa らの方法による一過性中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルを用いた。具体的には以下の通りである。Wister Rat オスを用いて、麻酔は笑気・酸素混合ガス (笑気 70%・酸素 30%) と 4% ハロタンで導入し、その後はハロタンを 2% へ下げて維持し、自

発呼吸下で手術を施行した。頸部正中切開を行い、右総頸動脈、外頸動脈、内頸動脈、pterygopalatine A. を露出し、内頸動脈、総頸動脈を mini clip にてクランプ、pterygopalatine A. を結紮した後、外頸動脈を遠位端で切離翻転した。外頸動脈より 4-0 ナイロン糸にラバー (SURFLEX F; GC corporation, 東京) をコーティングした塞栓子を約 1.7 mm 挿入し、中大脳動脈起始部で血流を遮断した。1 時間の虚血負荷後、塞栓子を抜去し、外頸動脈よりポリエチレンチューブ (PE 10; INTRAMEDIC 社 外径 0.61 mm、内径 0.28 mm) を挿入し内頸動脈まで進め、GM-CSF 5 ng / 生理食塩水 0.3 ml あるいは生理食塩水 0.3 ml を注入した。チューブ抜去後内頸動脈、総頸動脈を開放し再灌流させ、閉創し手術を終了した。脳梗塞体積の評価は、再灌流 48 時間後にラットを屠殺し、生理食塩水にて灌流後、脳切片 (厚さ 2 mm で 5 スライス) を作成し、2% - 2,3,5-Triphenyl-Tetrazolium-Chloride (TTC, SIGMA 社) 生理食塩水にて染色を行った (Stroke 1986 Nov-Dec; 17(6):1304-8, Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL)。正常部分は赤く染色されるが、梗塞巣は染まらないため、白い部分として観察される。各切片の TTC 染色像をスキャナーで取り込み、梗塞面積を算出し、梗塞面積 \times 2 mm で梗塞体積とし、さらに 5 スライスの梗塞体積の総和を総脳梗塞体積として解析を行った。神経学的所見は、Menzies のスケールを用いて解析を行った (Neurosurgery 1992 Jul; 31(1):100-6; discussion 106-7; Menzies SA, Hoff JT, Betz AL)。Menzies の神経所見スコアは以下の表 1 のとおりである。

(表 1)

スコア	評 価
0	明確な欠損なし
1	対側前肢の屈曲
2	尾を引っ張る間、対側前肢の制御が低下
3	各方向への自発的運動； 尾を引っ張る場合にのみ対側旋回
4	自発的対側旋回

図 17 に脳梗塞 (MCAO) 48 時間後の代表的な TTC 染色像を示したが、GM-CSF を脳梗塞直後に血管内投与したところ、明らかな
 5 脳梗塞巣の減少が観察された。定量的な解析結果を図 18、19 に示したが、GM-CSF 投与により、総脳梗塞体積のみならず、大脳皮質 (cortex) における脳梗塞体積が明らかに減少していた。図 20 に脳梗塞直後と 48 時間後における GM-CSF 投与およびコントロール群の神経学的所見を示した。脳梗塞直後では両群間に明らかな差が認められな
 10 かったが、48 時間後では、GM-CSF 投与により、脳梗塞後の神経所見が有意に改善されることが明らかとなった。

脳梗塞巣が減少したことが、どのような機序によるのかを明らかにするため、脳梗塞境界領域 (penumbra) (図 17 に MCAO 後の脳梗塞境界領域を示した) における細胞死 (アポトーシス) の解析を行った。脳梗
 15 塞 (MCAO) 48 時間後に脳切片を作製し、TUNEL 染色 (Apotag kit; Intergen 社) によりアポトーシスを解析した。代表的な TUNEL 染色像を図 21 に示したが、GM-CSF 投与により、脳梗塞境界領域における細胞死の抑制が観察された。脳梗塞境界領域における細胞死の定量的な解析を行ったところ、GM-CSF 投与により、明らかに細

胞死が減少することが明らかとなった(GM-CSF群, n=7; 20.3 ± 6.0 , 生理食塩水群, n=9; $73.2 \pm 19.1/0.06 \text{ mm}^2$: $p < 0.05$; unpaired t-test)。

- また、インビトロでGM-CSFはミクログリアを活性化することや、
- 5 活性化ミクログリアは様々な神経栄養因子を分泌することが知られていることから、GM-CSFの血管内投与による脳梗塞境界領域における活性化ミクログリアの解析を行った。脳梗塞(MCAO)48時間後に脳切片を作製し、OX42抗体(Serotec社)を用いてミクログリアの解析を行った。代表的なOX42染色像を図22に示したが、GM-CSF投与により、活性化ミクログリアの数が増加していることが明らかとなった。脳梗塞境界領域における細胞数の定量的な解析を行ったところ、GM-CSF投与により、活性化ミクログリア細胞数が増加する傾向が観察された(GM-CSF群, n=8; 59.5 ± 16.5 , 生理食塩水群, n=9; $28.8 \pm 5.1/0.24 \text{ mm}^2$: $p = 0.08$; unpaired t test)。
- 10
- 15 以上の結果より、GM-CSFを投与することより、脳内ミクログリアが活性化され、分泌された神経栄養因子などの作用により細胞死が抑制されたのではないかと考えられた。

産業上の利用可能性

- 20 本発明によると、神経損傷又は神経機能不全疾患の移植治療等に最も重要である神経幹細胞をインビトロ、インビボで効率良く増殖誘導することができる。

請 求 の 範 囲

1. 神経幹細胞を、樹状細胞、血球系細胞若しくはこれら細胞の培養上清、又は顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）の
- 5 少なくともいずれか一種と接触させることを特徴とする神経幹細胞の増殖誘導方法。
2. 神経幹細胞を、樹状細胞、血球系細胞、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）の少なくともいずれか一種と培養培地中で接触させることを特徴とする請求項1記載の神経幹細胞の増殖誘導
- 10 方法。
3. 神経幹細胞を含む哺乳類神経組織を分離し、成長因子を含む培養培地中で神経幹細胞を選択的に培養し、次いで神経幹細胞と樹状細胞及び／又は血球系細胞とを共培養することを特徴とする請求項2記載の神経幹細胞の増殖誘導方法。
- 15 4. 神経幹細胞を含む哺乳類神経組織を分離し、成長因子を含む培養培地中で神経幹細胞を選択的に培養し、次いで樹状細胞の培養上清及び／又は血球系細胞の培養上清中で神経幹細胞を培養することを特徴とする請求項2記載の神経幹細胞の増殖誘導方法。
5. 成長因子を含む培養培地が、少なくともEGF及び／又はFGFを
- 20 含む培養培地であることを特徴とする請求項2～4のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導方法。
6. 樹状細胞が、細胞表面にCD11cの表面マーカー有する未成熟樹状細胞サブセット、又は該未成熟樹状細胞に由来する成熟樹状細胞サブセットであることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導方法。
- 25 7. 血球系細胞が、脾細胞、T細胞、単球、好中球、好酸球又は好塩基

球であることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導方法。

8. 樹状細胞、血球系細胞若しくはこれら細胞の培養上清、又は顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) の少なくともい

5 れか一種を備えていることを特徴とする神経幹細胞の増殖誘導セット。

9. さらに、成長因子を含む培養培地を備えていることを特徴とする請求項 8 記載の神経幹細胞の増殖誘導セット。

10. 成長因子を含む培養培地が、少なくとも EGF 及び／又は FGF を含む培養培地であることを特徴とする請求項 9 記載の神経幹細胞の増

10 殖誘導セット。

11. 樹状細胞が、細胞表面に CD11c の表面マーカーを有する未成熟樹状細胞サブセット、又は該未成熟樹状細胞に由来する成熟樹状細胞サブセットであることを特徴とする請求項 8 ～ 10 のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導セット。

15 12. 血球系細胞が、脾細胞、T細胞、単球、好中球、好酸球又は好塩基球であることを特徴とする請求項 8 ～ 11 のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導セット。

13. 請求項 1 ～ 7 のいずれか記載の増殖誘導方法により得られる神経幹細胞を有効成分とすることを特徴とする神経損傷又は神経機能不全疾患の治療薬。

20

14. 請求項 8 ～ 12 のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導セットを有効成分とすることを特徴とする神経損傷又は神経機能不全疾患の治療薬。

15. 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) を有効成分とすることを特徴とする脳梗塞の治療薬。

25

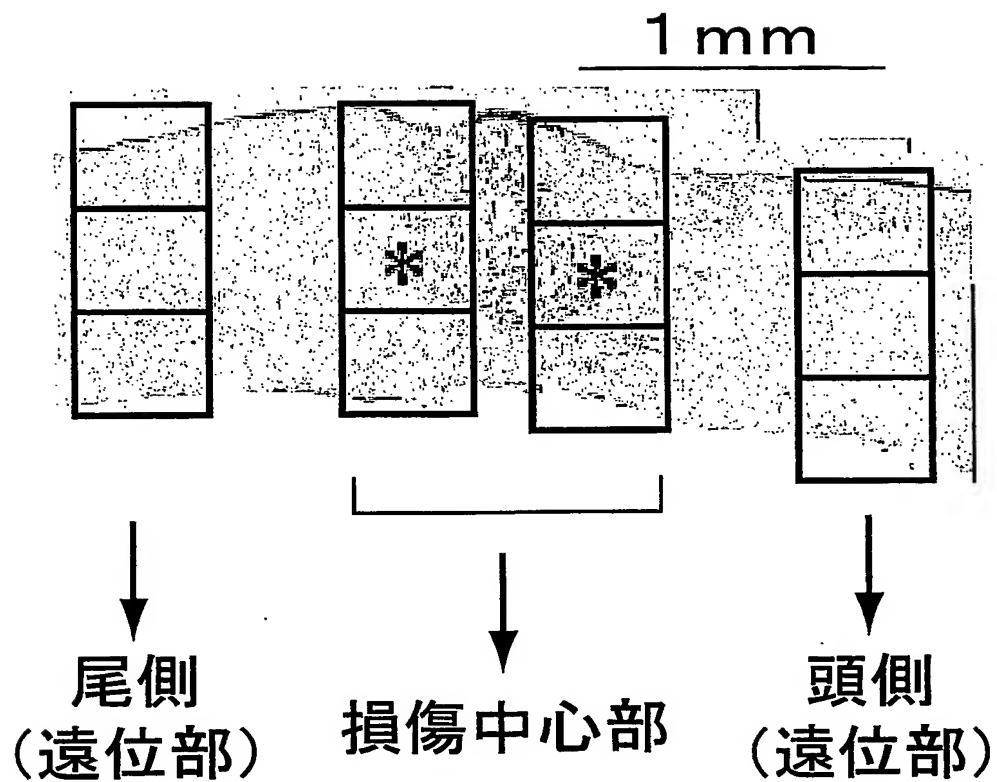
16. 請求項 1 ～ 7 のいずれか記載の増殖誘導方法により得られる神経

幹細胞を投与することを特徴とする神経損傷又は神経機能不全疾患の治療方法。

17. 請求項8～12のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導セットを投与することを特徴とする神経損傷又は神経機能不全疾患の治療方法。

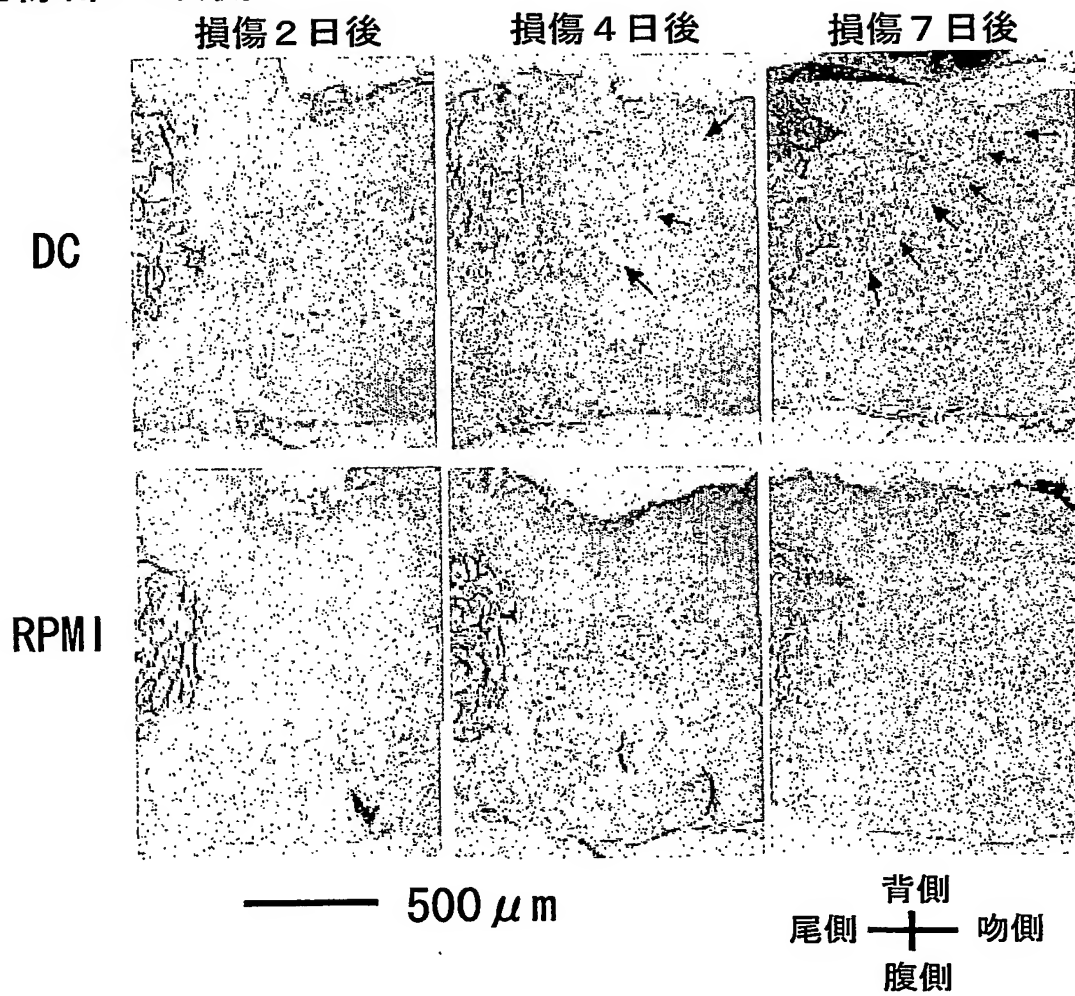
- 5 18. 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）を投与することを特徴とする脳梗塞の治療方法。

第 1 図

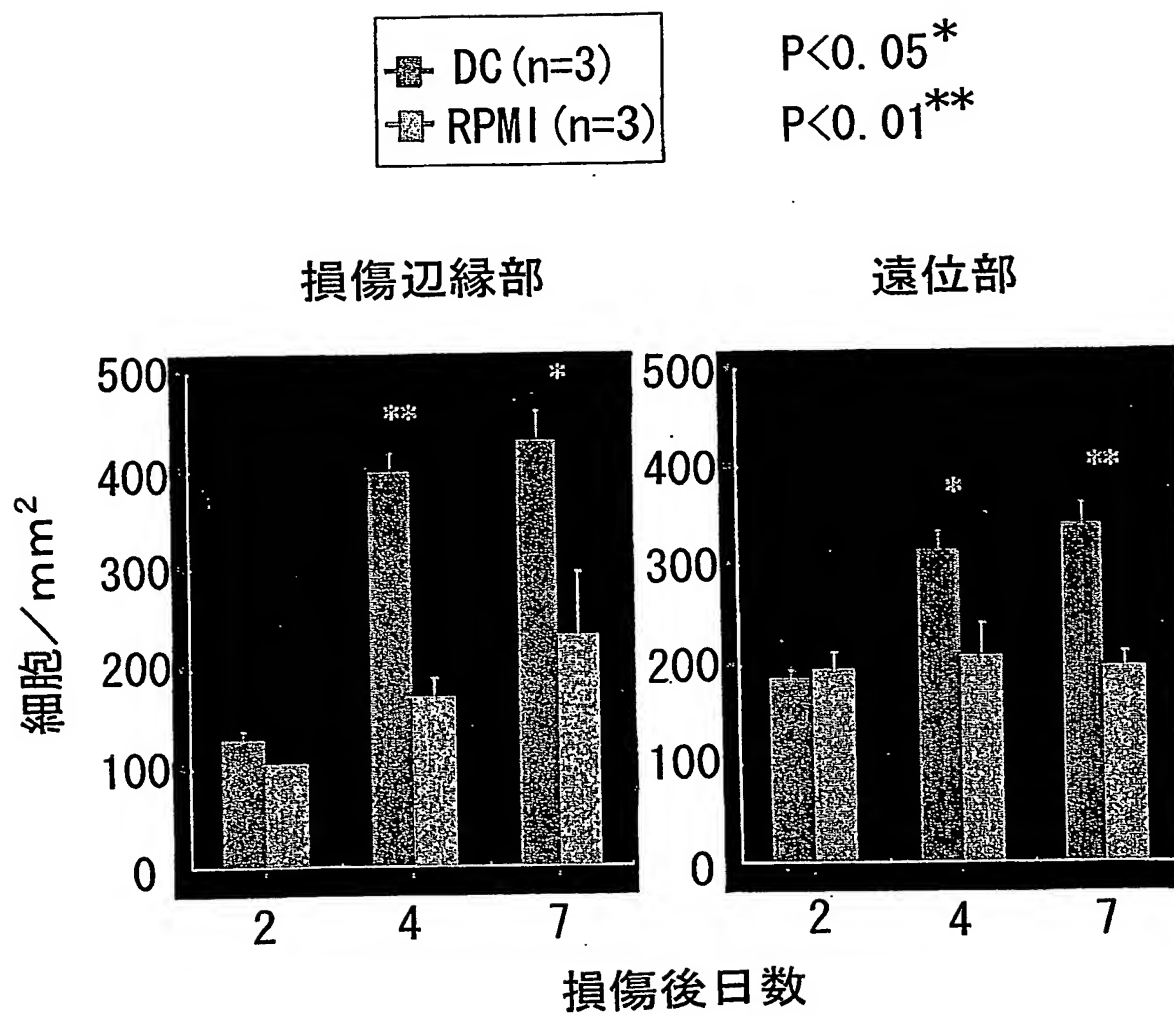


第 2 図

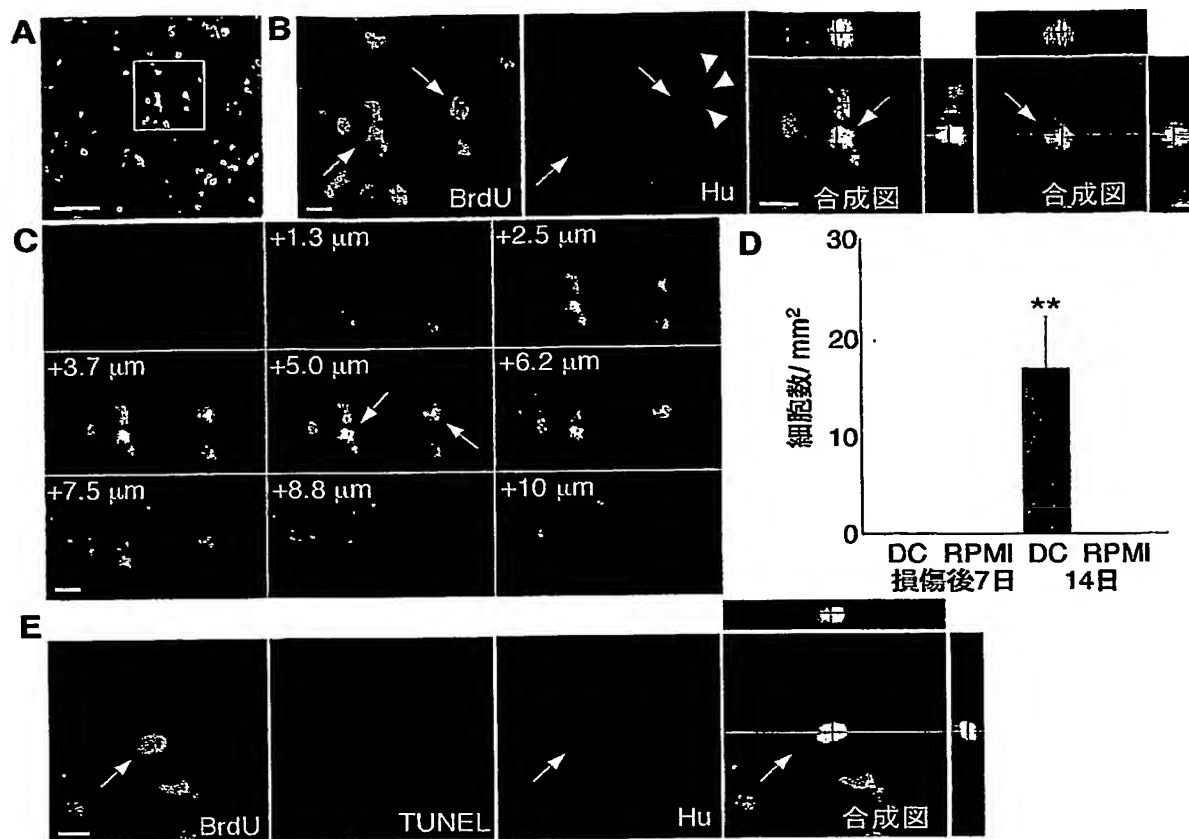
損傷辺縁部～頭側



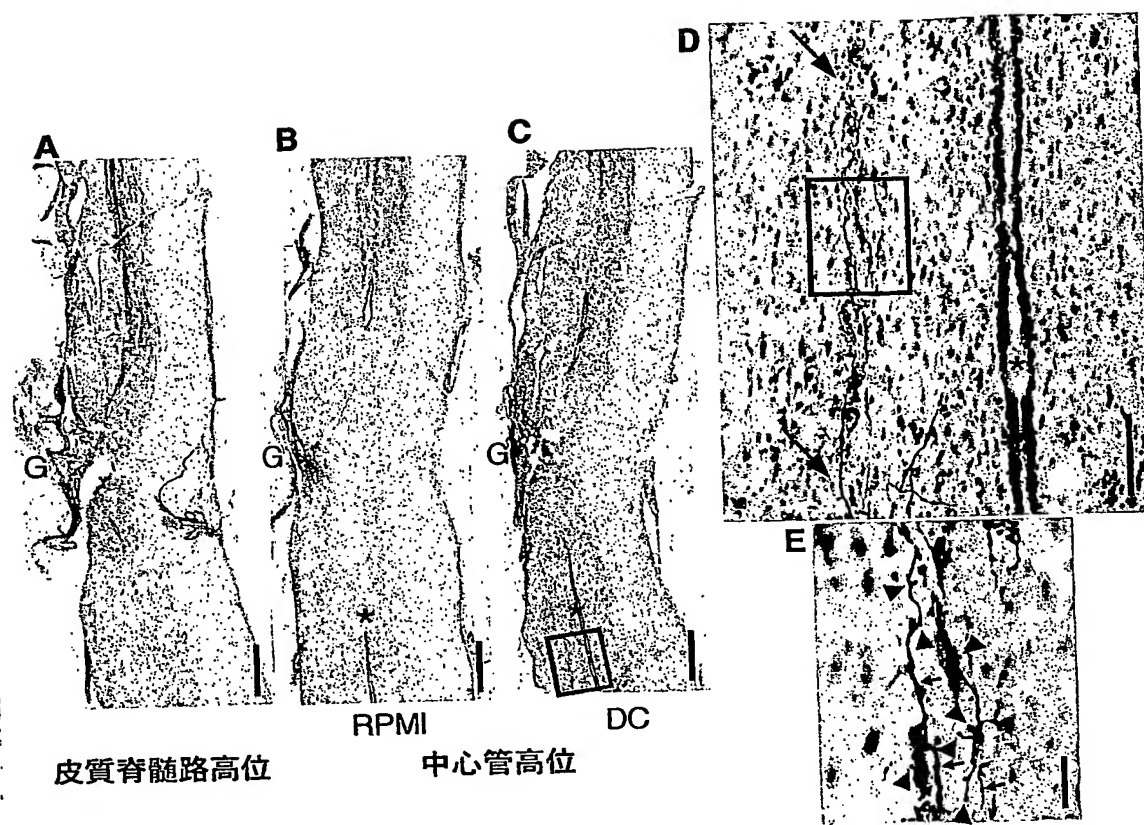
第 3 図



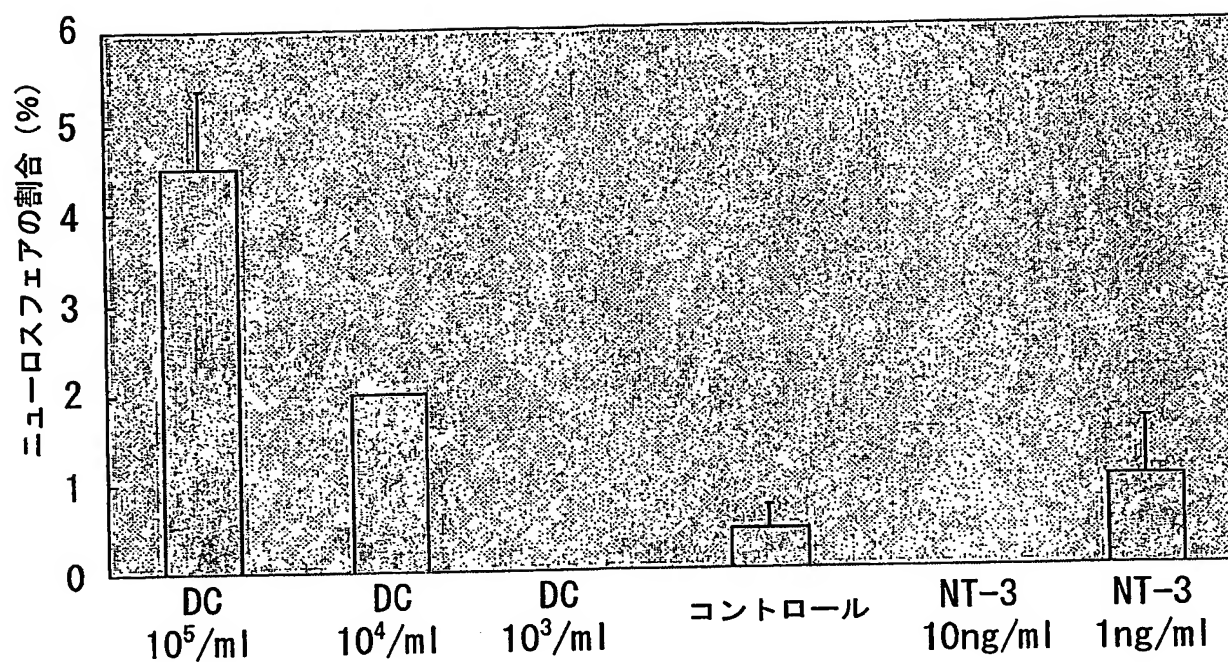
第 4 図



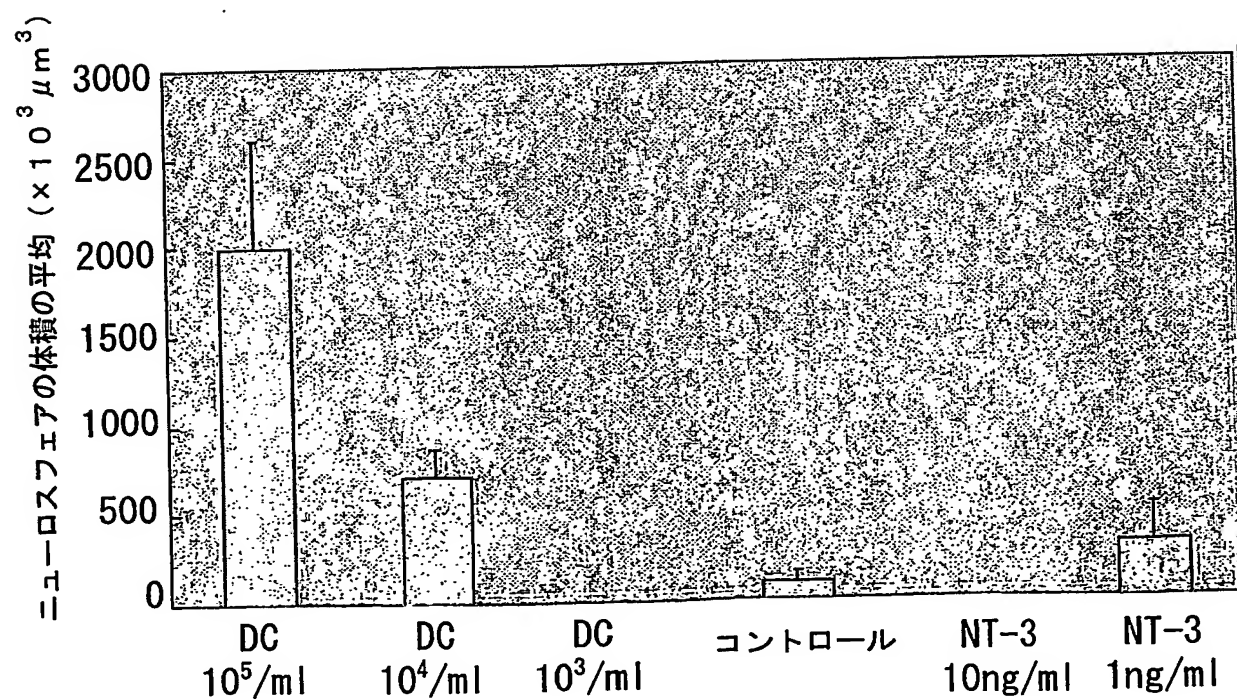
第 5 図



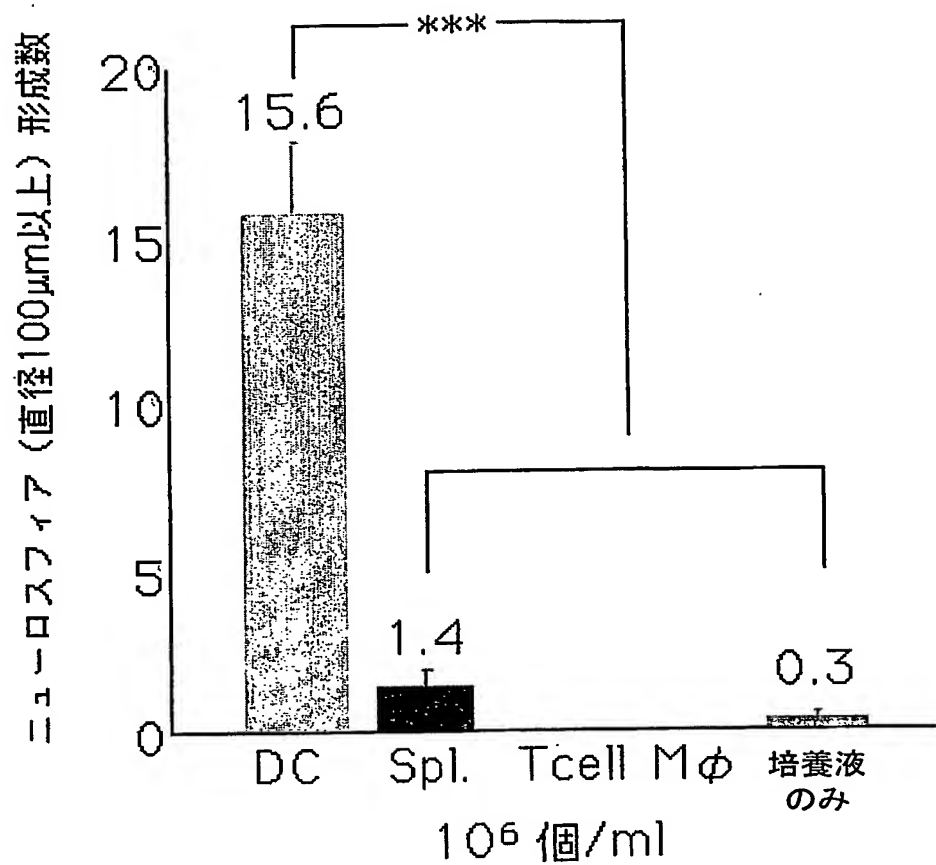
第 6 図



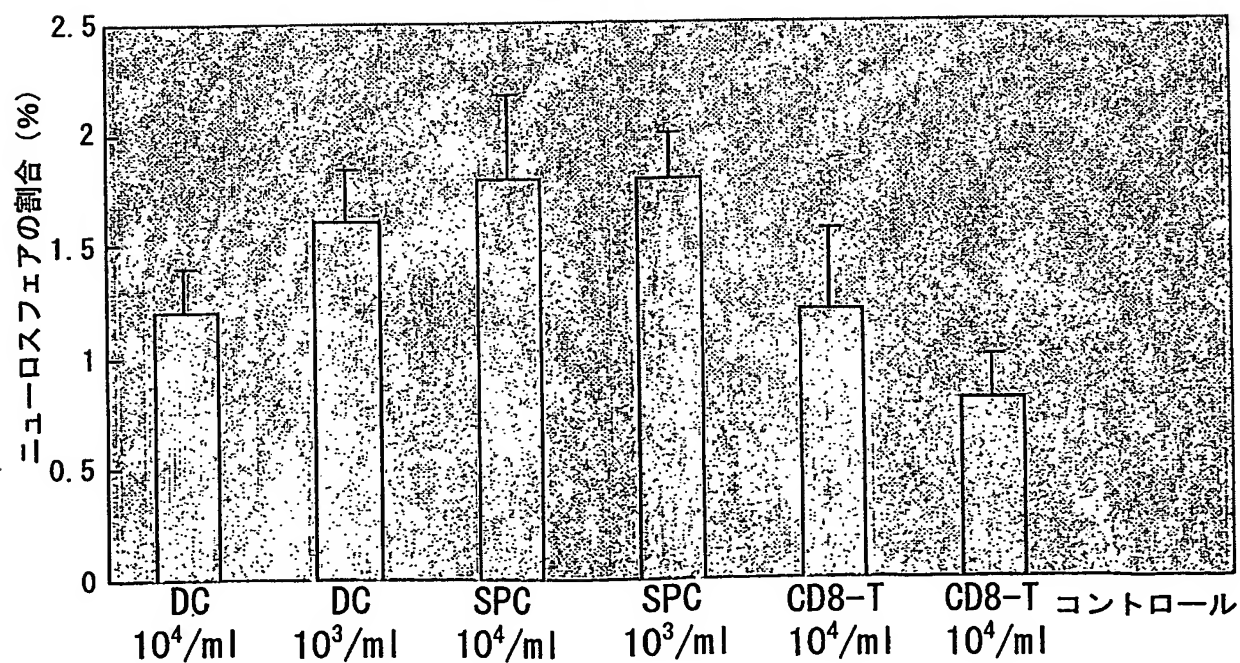
第 7 図



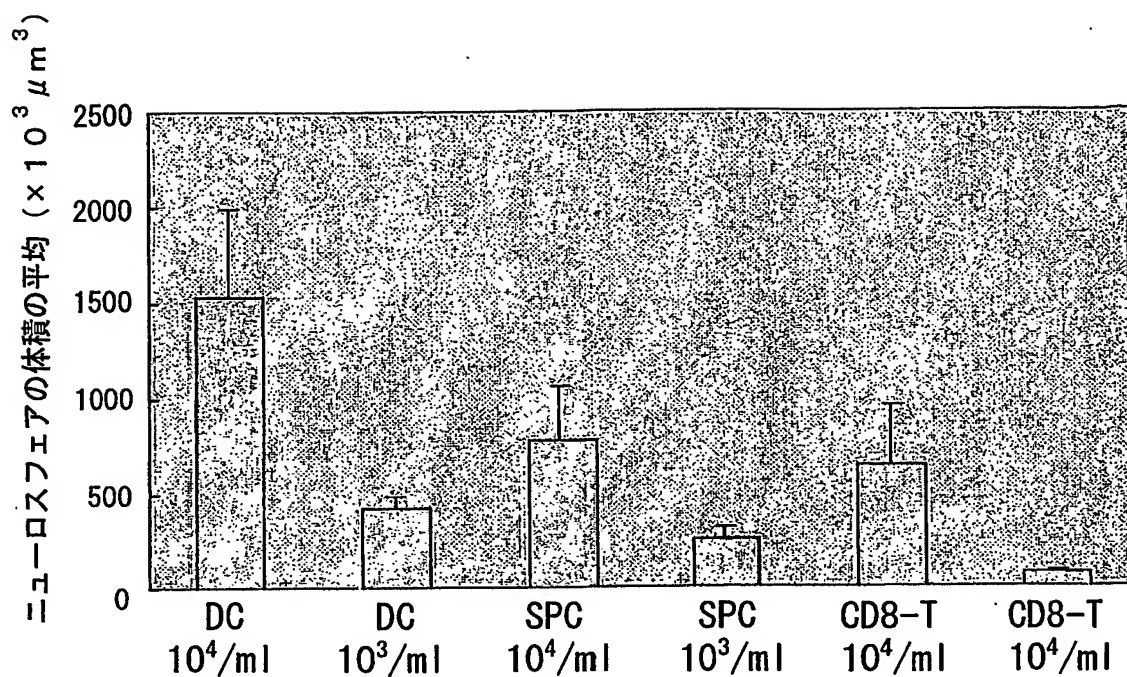
第 8 図



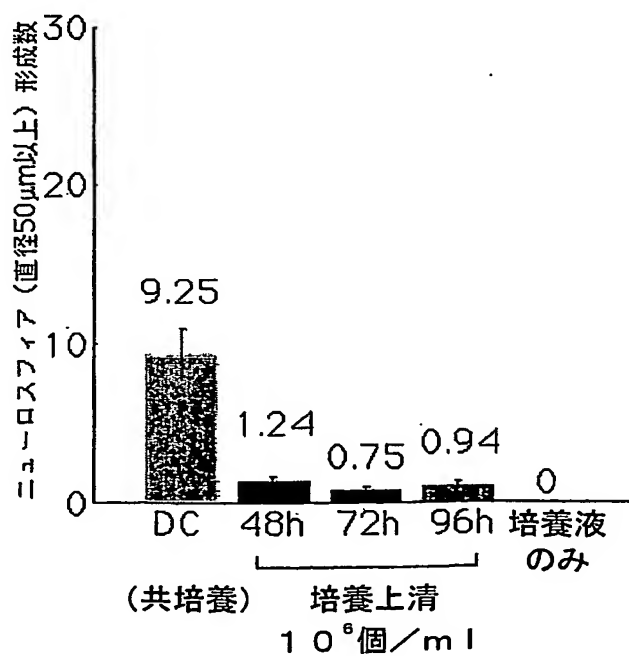
第 9 図



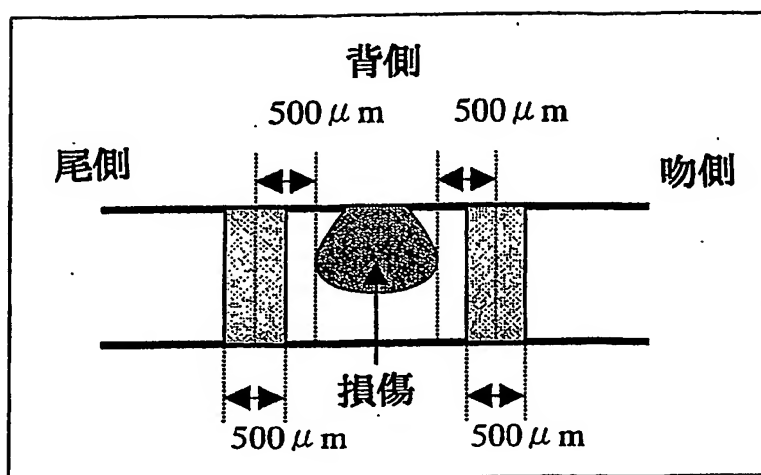
第 10 図



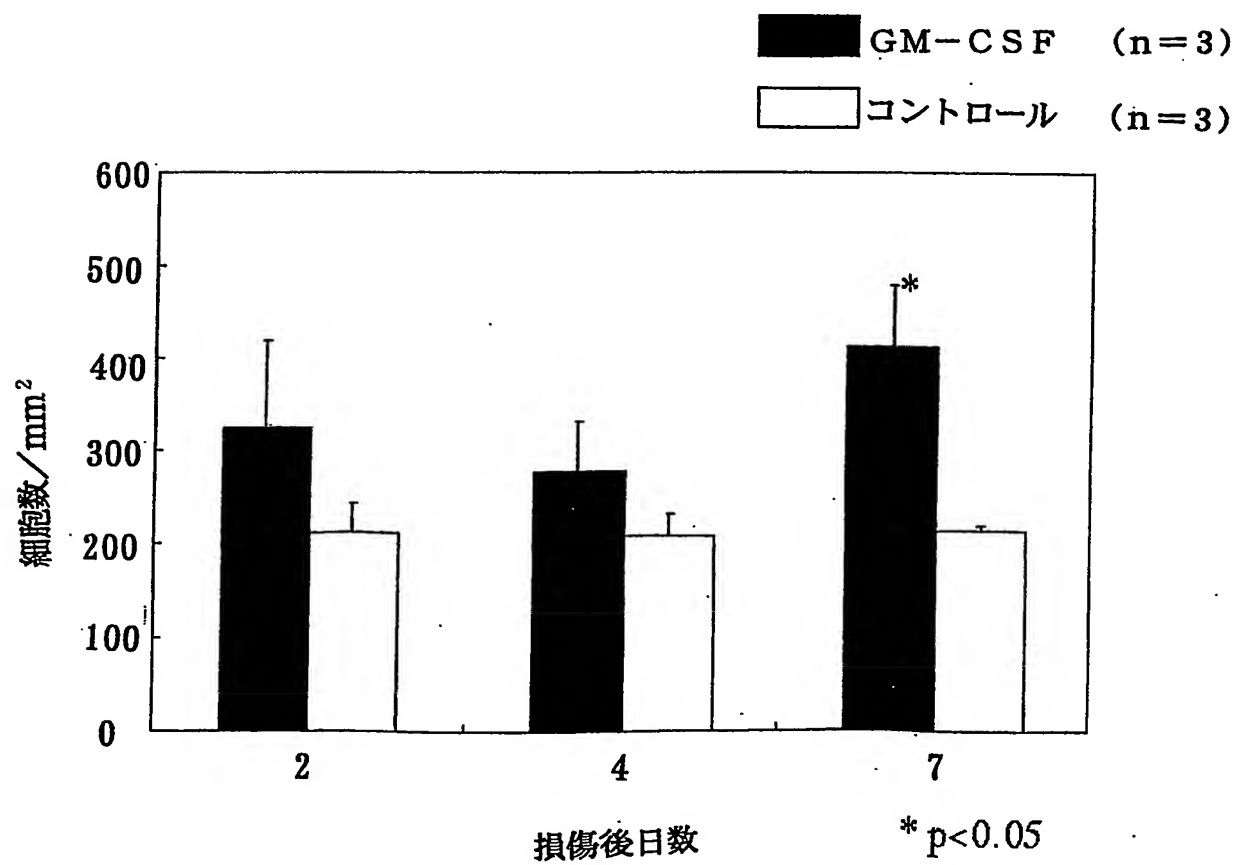
第 11 図



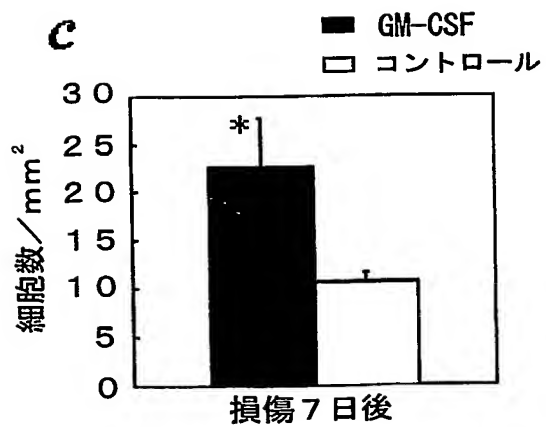
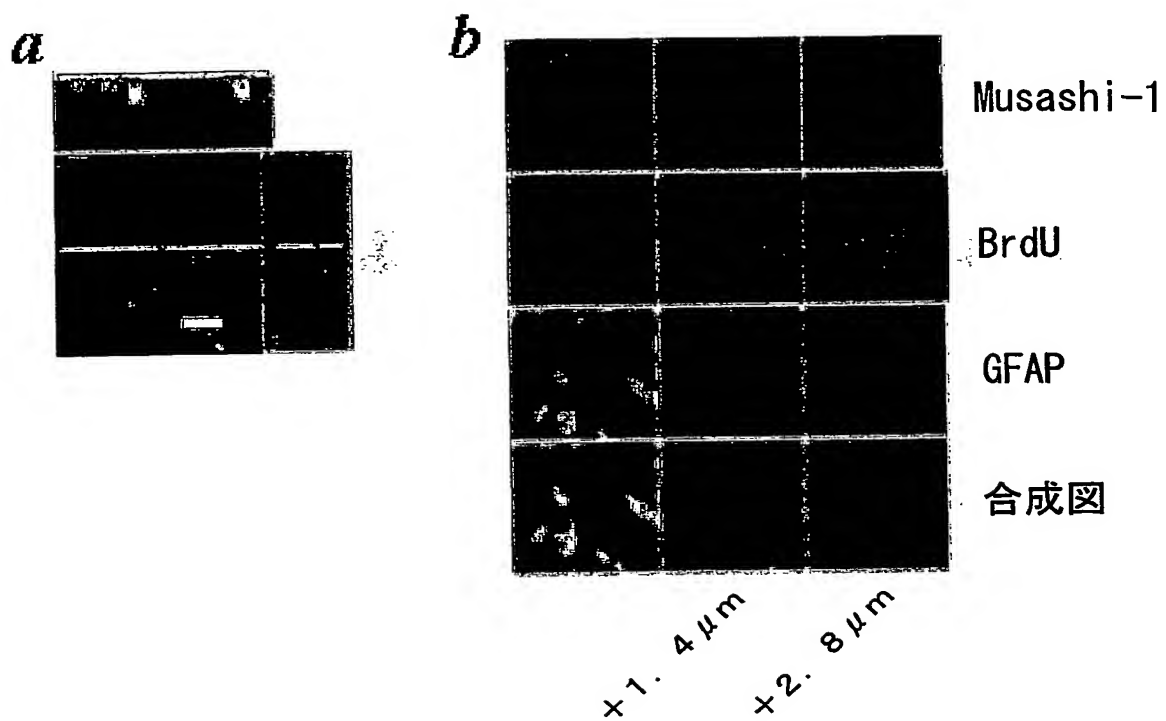
第 1 2 図



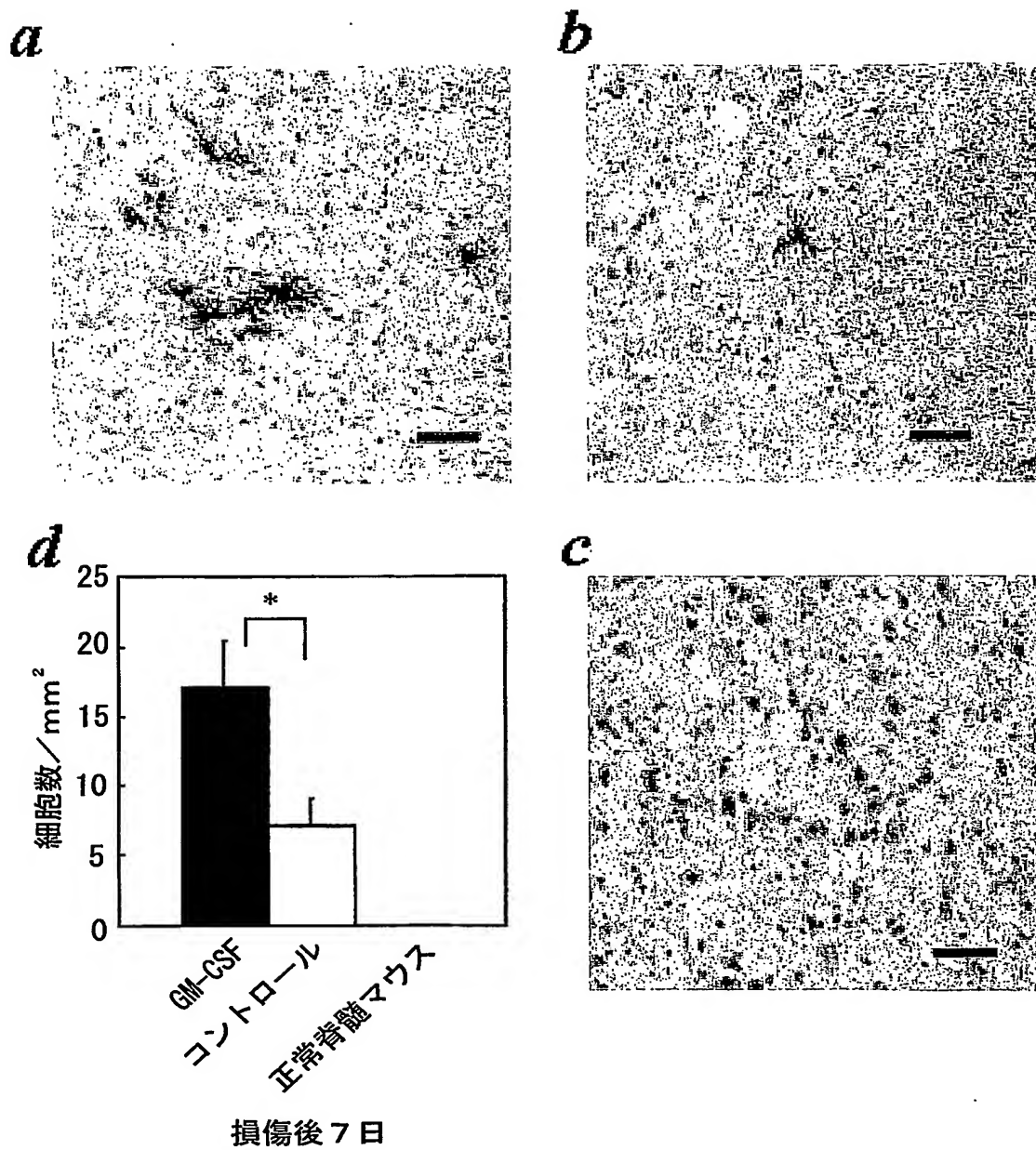
第 1 3 図



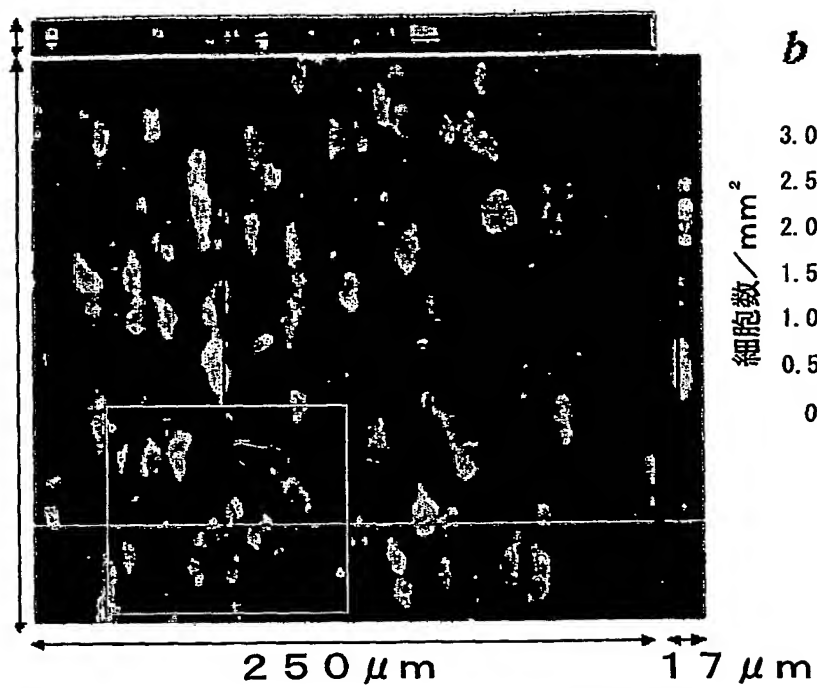
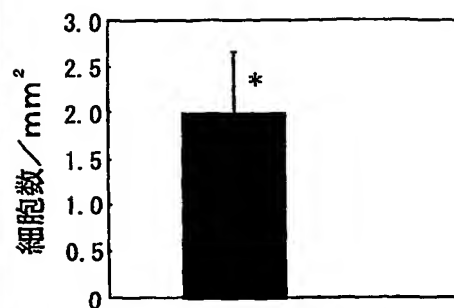
第 14 図



第 15 図



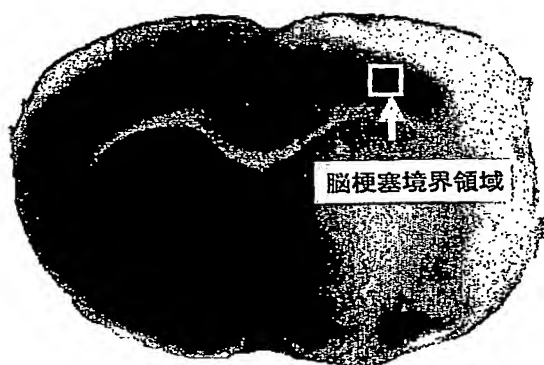
第 16 図

a*b*

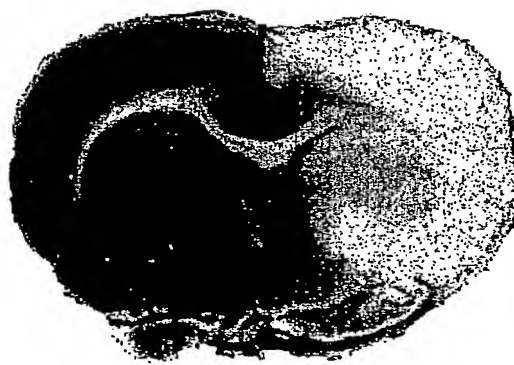
損傷後14日 (n=3)

■ GM-CSF
□ コントロール

第 17 図



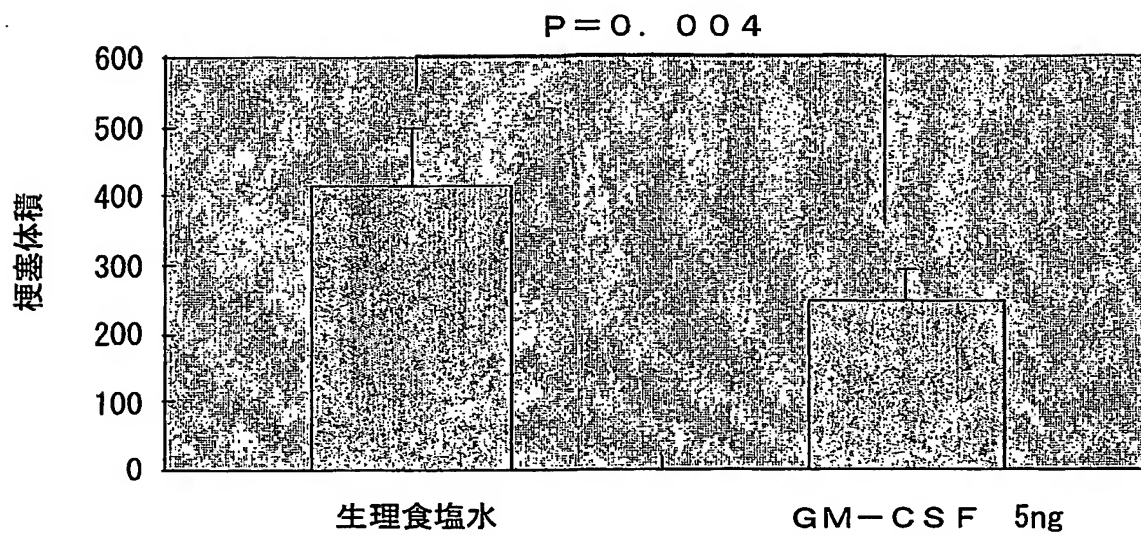
GM-CSF 5 ng



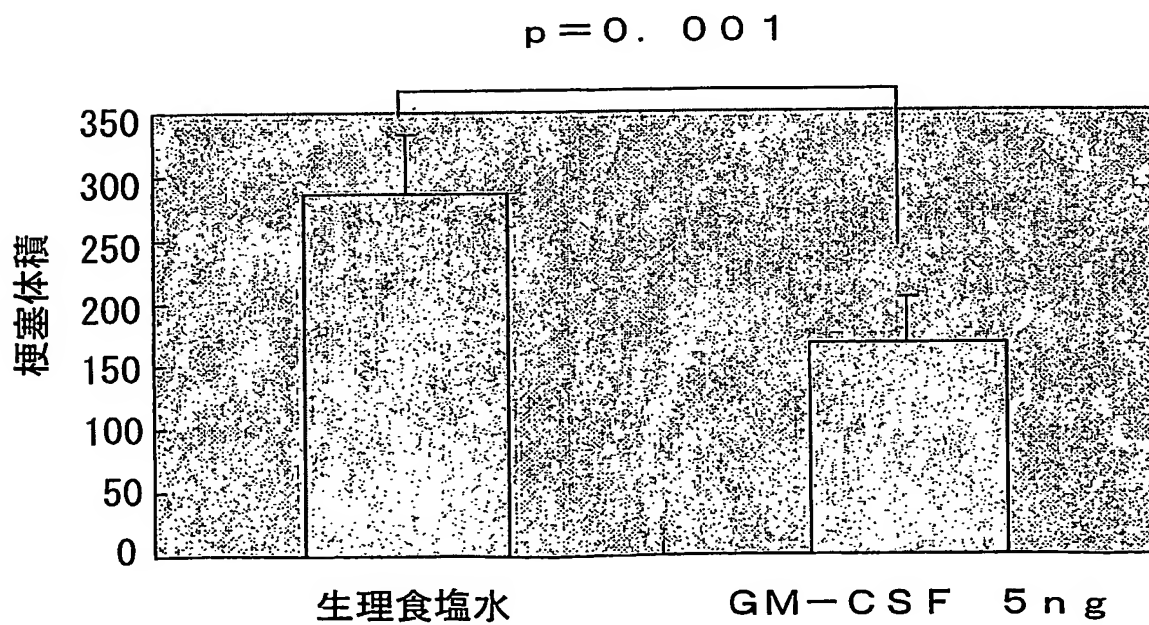
生理食塩水

第 18 図

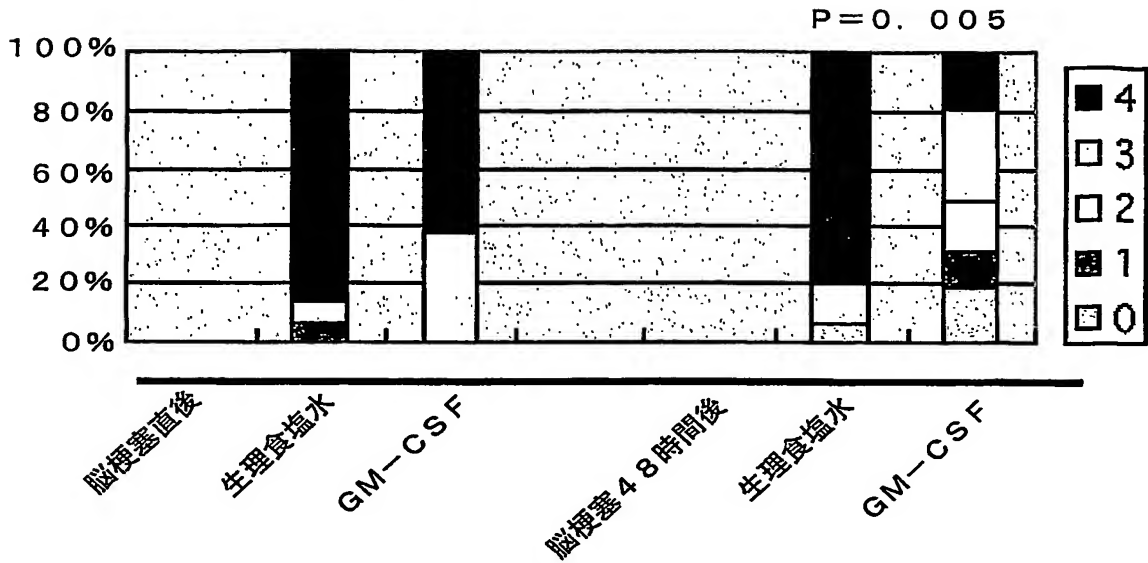
脑梗塞総体積

 $n = 5$

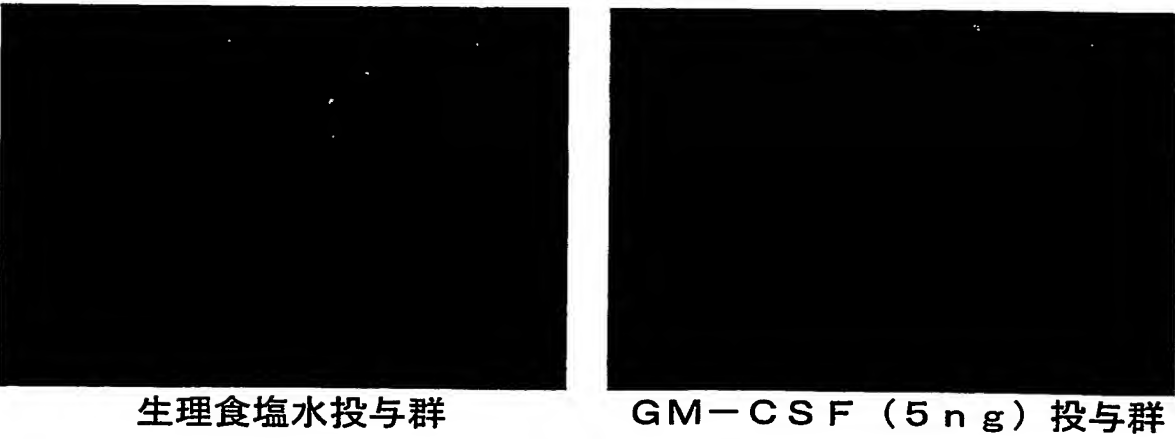
第 19 図

 $n = 5$

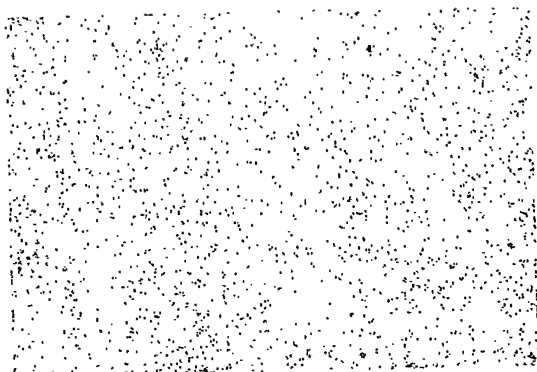
第 20 図



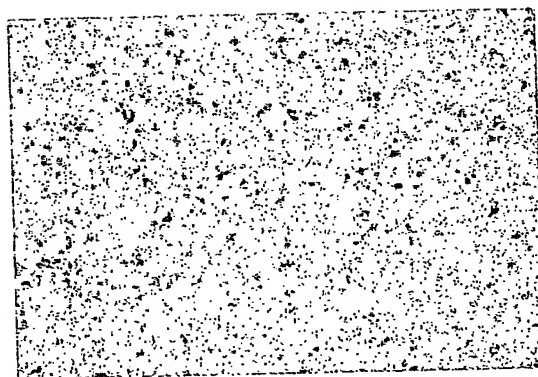
第 21 図



第 22 図



生理食塩水投与



GM-CSF (5 ng) 投与

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03868

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N5/02, C12N5/06, C12N5/08, A61K35/12, A61K38/19,
A61P25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N5/02, C12N5/06, C12N5/08, A61K35/12, A61K38/19,
A61P25/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTplus/JST7580 (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ARSENIJEVIC, Y. et al., Insulin-like growth factor-I is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2, J. Neurosci., 2001, Vol.21, No.18, pages 7194 to 7202	1-18
A	TROPEPE, V. et al., Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon, Dev.Biol., 1999, Vol.208, No.1, pages 166 to 188	1-18
A	WANG, Q. et al., Dendritic cells support hematopoiesis of bone marrow cells, Transplantation, 2001, Vol.72, No.5, pages 891 to 899	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 25 June, 2003 (25.06.03)	Date of mailing of the international search report 08 July, 2003 (08.07.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03868

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 18 have a common matter of "bringing nerve stem cells into contact with a certain substance and inducing the growth". However, it had been publicly known to bring nerve stem cells into contact with various substances thereby inducing the growth, as stated in, for example, "J. Neurosci, 2001, Vol.21, No.18, p.7194-7202", "Development biology, 1999, Vol.208, p.166-188", etc. Therefore, the matter "bringing nerve stem cells into contact with a certain substance and inducing the growth" common to the inventions as set forth in claims 1 to 18 cannot be considered as a special technical feature. Accordingly, it does not appear that there is a technical relationship among the inventions (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
The parts relating to "bringing nerve stem cells into contact with dendritic cells and thus inducing the growth" in the inventions as set forth in claims 1 to 18.

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

as set forth in claims 1 to 10 involving one or more of the same or corresponding special technical features and these inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. Such being the case, the inventions claimed in the present application have three groups of inventions including: (1) the parts relating to "bringing nerve stem cells into contact with dendritic cells and thus inducing the growth" in the inventions as set forth in claims 1 to 18; (2) the parts relating to "bringing nerve stem cells into contact with blood cell-type cells and thus inducing the growth" in the inventions as set forth in claims 1 to 18; and (3) the parts relating to "bringing nerve stem cells into contact with GM-CSF and thus inducing the growth" in the inventions as set forth in claims 1 to 18.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N5/02, C12N5/06, C12N5/08, A61K35/12, A61K38/19, A61P25/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N5/02, C12N5/06, C12N5/08, A61K35/12, A61K38/19, A61P25/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), MEDLINE(STN), JSTplus/JST7580(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ARSENIJEVIC, Y. et al., Insulin-like growth factor-I is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2, J Neurosci, 2001, Vol. 21, No. 18, p. 7194-7202	1-18
A	TROPEPE, V. et al., Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon, Dev Biol, 1999, Vol. 208, No. 1, p. 166-188	1-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.06.03

国際調査報告の発送日

08.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

七條 里美



4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WANG, Q. et al., Dendritic cells support hematopoiesis of bone marrow cells, Transplantation, 2001, Vol.72, No.5, p.891-899	1-18

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-18に記載された発明に共通する事項は、「神経幹細胞をある物質と接触させて増殖誘導すること」である。しかし、例えば「J Neurosci, 2001, Vol. 21, No. 18, p. 7194-7202」、「Development biology, 1999, Vol. 208, p. 166-188」等に記載されるように、既に、神経幹細胞をさまざまな物質と接触させて増殖誘導することは公知であるから、請求の範囲1-18に記載された発明に共通する事項である「神経幹細胞をある物質と接触させて増殖誘導すること」は、特別な技術的特徴であるとはいえない。そうすると、請求の範囲1-10に記載された発明は、特別な技術的特徴を含む技術的な関係にあるものとはいえず、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。したがって、本出願の請求の範囲に記載された発明には、(1)請求の範囲1-18に記載された発明のうち「神経幹細胞を樹状細胞に接触させて増殖誘導すること」に関する部分、(2)請求の範囲1-18に記載された発明のうち「神経幹細胞を血球系細胞に接触させて増殖誘導すること」に関する部分、(3)請求の範囲1-18に記載された発明のうち「神経幹細胞をGM-CSFに接触させて増殖誘導すること」に関する部分の3発明が包含されている。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-18に記載された発明のうち「神経幹細胞を樹状細胞に接触させて増殖誘導すること」に関する部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.